

Klinik für Kleintiermedizin
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktorin: Prof. Dr. Claudia E. Reusch

Arbeit unter Leitung von Dr. Bernhard Gerber

**Zum Verlauf und Vorkommen von Glomerulonephritis und
Antikörpertitern gegen *Borrelia burgdorferi* bei Berner
Sennenhunden**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Katharina Haug

Tierärztin
von Freiburg im Breisgau, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Claudia E. Reusch, Referentin

Prof. Dr. Max M. Wittenbrink, Korreferent

Zürich 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Allgemeiner Teil.....	1
1.1.1	Borreliose	1
1.1.1.1	Vorkommen	1
1.1.1.2	Übertragungswege	1
1.1.1.3	Pathogenese	1
1.1.1.4	Klinische Symptome	2
1.1.1.5	Diagnose	3
1.1.1.6	Pathologische Befunde.....	4
1.1.1.7	Therapie	4
1.1.1.8	Prophylaxe	4
1.1.2	Glomerulonephritis	5
1.1.2.1	Physiologie	5
1.1.2.2	Klinische Befunde.....	6
1.1.2.3	Labordiagnostische Befunde	6
1.1.2.4	Einteilung.....	7
1.1.2.4.1	Glomeruläre Erkrankungen	7
1.1.2.4.2	Tubulointerstitielle Läsionen in Zusammenhang mit glomerulären Erkrankungen	8
1.1.2.5	Therapie	8
1.1.2.6	Prognose	8
1.2	Spezieller Teil	9
1.2.1	Borreliose und Glomerulonephritis	9
1.2.2	Verlaufsuntersuchungen.....	10
1.3	Ziele.....	11
2	Material und Methode.....	11
2.1	Hunde.....	11
2.2	Probenmaterial	12
2.2.1	Probenentnahme	12
2.2.2	Weiterverarbeitung des Probenmaterials	12
2.2.2.1	Hämatologie, Blutchemie.....	13
2.2.2.2	Urinanalyse	13
2.2.2.3	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) für Borrelien	13
2.2.2.3.1	Borrelien-ELISA nach Wittenbrink	14
2.2.2.3.2	SNAP [®] ₃ Dx TM - C ₆ -ELISA	15
2.2.2.4	Western Blot für Borrelien	15
2.2.2.5	Bakteriologische Untersuchung der Harnproben	16
2.2.2.6	Natrium-Dodecyl-Sulfat-Agarose-Gel-Elektrophorese (SDS-AGE).....	16
2.2.2.7	Mikroalbuminurietest	17
2.3	Statistik.....	17
3	Resultate	17
3.1	Hunde.....	17
3.2	Verstorbene Hunde	18
3.3	Besuchte Hunde.....	18
3.3.1	Untersuchungsabstand.....	18
3.3.2	Geographische Verteilung der im Feld untersuchten Hunde	18
3.3.3	Anamnese der erneut untersuchten Berner Sennenhunde und Kontrollhunde	19
3.3.3.1	Vergleich mit der vorhergehenden Studie	19

3.3.4	Hämatologie und Blutchemie der untersuchten Berner Sennenhunde und Kontrollhunde	19
3.3.5	Antikörper gegen <i>B. burgdorferi</i>	20
3.3.5.1	Ergebnis der Borreliose-Serologie.....	20
3.3.5.2	Vergleich des Borreliose-Serologie mit dem Ergebnis des C ₆ -ELISA (SNAP-Test)	20
3.3.6	Urinuntersuchung	20
3.3.6.1	Spezifisches Gewicht	20
3.3.6.2	Proteinurie	21
3.3.6.2.1	Urin-Protein-Kreatinin Quotient (UPC).....	21
3.3.6.2.2	UPC und Borreliose	21
3.3.6.2.3	Mikroalbuminurie	22
3.3.6.3	SDS-AGE der Harnproteine	22
3.4	Zusammenfassung der Resultate	22
4	Diskussion	23
4.1	Verstorbene Hunde	23
4.2	Erneut besuchte Hunde	24
4.2.1	Untersuchungsabstand	24
4.2.2	Fragebogen	24
4.2.3	Borreliose	25
4.2.3.1	Folgeuntersuchungen Borreliose	25
4.2.3.2	C ₆ -ELISA	27
4.2.4	Glomerulonephritis	28
4.2.4.1	Hämatologie und spezifisches Gewicht	29
4.2.4.2	Mikroalbuminurie	29
4.2.4.3	Proteinurie	30
4.2.4.4	SDS-AGE	31
4.2.5	Borreliose und Glomerulonephritis	32
5	Schlussfolgerungen	32
6	Tabellenverzeichnis	33
7	Abbildungsverzeichnis	33
8	Anhang	34
8.1	Tabellen.....	34
8.2	Abbildungen	44
9	Literaturverzeichnis	49

Zusammenfassung

In einer Vorstudie wurde gezeigt, dass Berner Sennenhunde (BSH) häufiger Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) aufweisen und häufiger unter Glomerulonephritis leiden als Hunde anderer Rassen. In der vorliegenden Studie wurden Hunde der Vorstudie erneut untersucht. Es wurde der Frage nachgegangen, wie sich bei BSH und Kontrollhunden die Häufigkeit von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* verändert und ob das Vorkommen von Proteinurie bei seropositiven Hunden zunimmt.

Von insgesamt 123 nachverfolgten Hunden waren 40 (33%) verstorben. 83 Hunde, 53 BSH und 30 Kontrollhunde konnten erneut untersucht werden. Nur von 8/40 (20%) der verstorbenen Hunde konnte die Todesursache mit Sicherheit festgestellt werden, nur bei einem Hund wurde Glomerulonephritis als Ursache gefunden. Von den untersuchten Hunden änderten 34/53 (64%) BSH und 22/30 (73%) Kontrollhunde ihren serologischen Status nicht, 8/53 (15%) BSH und 6/30 (20%) Kontrollhunde serokonvertierten und 11/53 (21%) BSH bzw. 2/30 (7%) Kontrollhunde serorevertierten. Eine Proteinurie wiesen 9/80 Hunde auf. Unter den 7 Hunden die neu eine Proteinurie aufwiesen waren 5 seropositive BSH und 2 seronegative Kontrollhunde. Die Häufigkeit von Proteinurie hatte nicht signifikant zugenommen. In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Borrelien-Antikörpern und Hinweisen auf eine Glomerulopathie hergestellt werden; es bleibt weiterhin unklar warum BSH häufiger an Glomerulonephritis erkranken.

Abstract

In a preliminary study Bernese Mountain Dogs (BMD) not only show more often antibodies against *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) but also are more often affected by glomerulonephritis than dogs of other breeds. In the present study dogs were reexamined. The aim was to evaluate the change in frequency of antibodies against *B. burgdorferi* in BMD and control dogs as well as to investigate if there is an increasing incidence of proteinuria in seropositive dogs.

Of 123 reevaluated dogs, 40 (33%) had died in the meantime. 83 dogs, 53 BMD and 30 control dogs, could be reexamined. In 8/40 dead dogs the cause of death was confirmed by pathology oder cytology, and in only 1 dog glomerulonephritis was the cause of death. 34/53 (64%) BMD and 22/30 (73%) control dogs did not change their serological status. 8/55 (15%) BMD and 6/30 (20%) of control dogs seroconverted and 11/53 (21%) BMD and 2/30 (7%) control dogs seroreverted. Nine of 80 dogs showed proteinuria. Five of the 7 dogs, that developed proteinuria in the meantime were seropositive BMD and the remaining 3 were seronegative control dogs. The incidence of dogs with proteinuria did not increase significantly.

The follow-up study could not show a correlation between the presence of antibodies against *B. burgdorferi* and the presence of a glomerulopathy. It still remains unclear why BMD suffer more often from glomerulonephritis.

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Teil

1.1.1 Borreliose

Der Erreger der Lyme-Borreliose wurde 1982 von Willy Burgdorfer entdeckt und 1984 als neue Borrelienart *Borrelia burgdorferi* (*B.burgdorferi*) klassifiziert. Die Erkrankung wurde das erste Mal 1975 in Lyme, Connecticut, USA, beschrieben. Bakterien des Genus *Borrelia* gehören zur Ordnung *Spirochaetales* (Spirochäten). Die Spezies *Borrelia burgdorferi* sensu lato kann in mindestens 11 weitere Genospezies eingeteilt werden, wobei die wichtigsten in Europa vorkommenden Genospezies *B. garinii* (39,7%), *B. afzelii* (37,1%), *B. burgdorferi* sensu stricto (15,9%), *B. valaisiana* (6,7%) *B. lusitaniae* (0,6%), *B. bissetti* und *B. spielmani* sind (Hubalek und Halouzka 1997; Saint Girons et al. 1998; Hanincova et al. 2003; Poupon et al. 2006). In Nordamerika scheint *B. burgdorferi* sensu stricto vorzuherrschen (Greene und Straubinger 2006). Neben dem Auftreten in unterschiedlichen Zeckenarten (*Ixodes scapularis* – vorher *Ixodes dammini* – *Ixodes pacificus*, *Ixodes neotomae*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*) gibt es Berichte über Funde von Borrelien in Flöhen, Moskitos und Fliegen (Hubalek et al. 1998; Greene und Straubinger 2006).

1.1.1.1 Vorkommen

Die Lyme-Borreliose steht üblicherweise eng mit waldreichen Gebieten in Verbindung; man kann sich jedoch auch in Parks grösserer Städte infizieren (Matuschka 1996_b; Smith 1996). Die Larven und Nymphen der infizierten Zecken leben vor allem in feuchten geschützten Gebieten, auf dem Boden von Laubwäldern, wo sie kleine Nager, Reptilien und Vögel parasitieren. Die adulten Zecken klettern auf Grashalme oder sonstige bodennahe Pflanzen und warten dort auf grössere Säugetiere (Greene und Straubinger 2006).

1.1.1.2 Übertragungswege

Es gibt keine Beweise dafür, dass infizierte Hunde oder Katzen ein direktes Risiko für den Menschen darstellen. Ein gewisses Risiko kann von durch Haustiere in die Wohnung verbrachten Zecken ausgehen, die von ihren Wirten abfallen, ehe sie vollgesogen sind. Bei einem in diesem Fall möglichen zweiten Saugakt, zum Beispiel an einem Menschen, wird weniger Zeit benötigt, um Borrelien zu übertragen (Greene und Straubinger 2006). Direkte horizontale Übertragung von Hunden und Katzen auf den Menschen ist unwahrscheinlich (Goossens 2001), eine Übertragung vom Hund auf den Hund scheint möglich zu sein (Cerri 1994), ebenso die transplazentare Übertragung bei parenteral infizierten Hündinnen (Gustafson et al. 1993).

1.1.1.3 Pathogenese

Die Übertragung der Borrelien dauert zwischen 24 und 50 Stunden (de Silva et al. 1996; Crippa et al. 2002), wobei mit *B. afzelii* infizierte Zecken früher ihren Wirt

infizierten, als mit *B. burgdorferi* sensu strictu infizierte Zecken (Crippa et al. 2002). In der Zeit zwischen Beginn des Saugaktes der Zecke am Wirt und der Übertragung mit dem Speichel vermehren sich die Bakterien in der Wirtszecke, wandern vom Darm in die Hämolymphe, weiter in die Speicheldrüse und infizieren von dort aus den Wirt (Pal 2004). OspA (Outer surface protein A), das vorherrschende Oberflächenprotein wird auf der Oberfläche der Borrelien exprimiert während sie sich im Mitteldarm infizierter Zecken befinden. Es hat sich gezeigt, dass sich die Borrelien mit Hilfe des OspA an die Epithelzellen des Mitteldarmes haften können. Nach einer Blutmahlzeit der Zecke wird die Expression von OspA herunterreguliert, die von OspC (Outer surface protein C) steigt an. Dies korreliert mit der Wanderung über die Hämolymphe in die Speicheldrüsen der Zecke, wo OspC nun den Borrelien bei der Anheftung an Speicheldrüsenzellen sowie wahrscheinlich auch an die Wirtszellen behilflich ist (Pal 2004). Eine Infektion mit Borrelien hat nicht zwangsläufig auch eine Erkrankung zur Folge. In einer Studie von Levy und Magnarelli (1992) zeigten nur 4,8% der Borrelien-positiven Hunde für Borreliose typische klinische Symptome, gleichzeitig zeigten jedoch 4,6% der serologisch negativen Hunde Symptome, die mit Borreliose in Verbindung gebracht werden können. Gründe für die hohe Anzahl an seropositiven Hunden bei geringer Morbidität könnten eine Infektion mit apathogenen Stämmen oder eine Fehldiagnose aufgrund der niedrigen Spezifität der serologischen Untersuchung sein (Anderson et al. 1990; Wormser et al. 2001). Die Ursache vieler Krankheitssymptome geht von der wirtseigenen Immunabwehr aus. So wird gegen Flagellin, eines der am stärksten immunogen wirkenden Proteine, ein Antikörper gebildet, der an neuroaxonale Proteine des Wirts bindet (Sigal 1994), und entzündliche Reaktionen des Nervengewebes hervorruft (Sigal und Williams 1997). In der Synovialmembran experimentell infizierter Hunde wurde eine vermehrte Expression von Interleukin-8 gefunden, welches neutrophile Granulozyten anlockt. Dies könnte ein wichtiger Mechanismus bei der Entwicklung von eitrigen Polyarthritiden darstellen (Straubinger et al. 1997). Einmal im Körper angekommen können die Borrelien persistieren und auf eine noch nicht vollständig geklärte Weise dem Immunsystem entgehen. So können Borrelien für die Immunantwort wichtige Oberflächenproteine verändern, sobald sie in ihren Wirt gelangt sind (de Silva et al. 1998). Untersuchungen ergaben, dass Borrelien ihre gesamte Hülle verändern: unter ungünstigen Bedingungen können die spiralförmigen Bakterien innerhalb von Minuten in eine kugelige Form übergehen (Brorson und Brorson 1997; Alban et al. 2000). Auf diese Weise können sie über mehrere Tage ohne Nahrung auskommen und sich, sobald sich die Bedingungen wieder bessern, in ihre bekannte Form zurückwandeln. Dies könnte ein Grund sein, warum *B. burgdorferi* noch nach Monaten antibakterieller Therapie mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) nachweisbar ist (Greene und Straubinger 2006).

1.1.1.4 Klinische Symptome

Die klinischen Symptome sind unspezifisch: Beim Mensch werden unter anderem Dermatitis, Arthritis, Meningoenzephalitis, Myokarditis, Konjunktivitis, Vitritis, Choroiditis, Hepatitis, Myositis oder Fasziiitis beschrieben (Greene und Straubinger 2006).

Krankheitszeichen bei Hunden treten zwei bis sechs Monate nach Zeckenexposition auf. Das Auftreten erster Krankheitsanzeichen korrelierte gewöhnlich mit dem Anstieg des Antikörper-Titers im Serum (Greene und Straubinger 2006).

Da, wie im Abschnitt 1.1.1 bereits angesprochen, in Amerika und Europa unterschiedliche Borrelienarten vorkommen, kann von den relativ gut erforschten Krankheitssymptomen, die in Amerika auftreten, nicht unbedingt auf die Symptome in Europa geschlossen werden. Folgende Krankheitssymptome wurden in Europa beschrieben: Fieber (39,5-40,5°C), Anorexie, Apathie, wechselnde Lahmheiten mit geschwollenen, schmerzhaften Gelenken (Polyarthritits) und Lymphadenomegalie (May et al. 1990; McKenna et al. 1995; Overduin und van den Bogaard 1997; Hovius et al. 2000).

Es gibt ausserdem Berichte über Nierenveränderungen, die in Zusammenhang mit Borreliose in der Tiermedizin (Magnarelli et al. 1987; Grauer et al. 1988; Preiss 1991; Reusch et al. 1991; Minkus et al. 1994; Reusch et al. 1994; Dambach et al. 1997; Shanies et al. 2005; Summers et al. 2005), wie auch in der Humanmedizin (Kelly et al. 1999; Kirmizis et al. 2004) gesehen wurden.

Leider sind gerade Gliedmassen- und Gelenksbeschwerden wie Schmerzhaftigkeit, Schwellung und Lahmheit in Zusammenhang mit Fieber und Inappetenz sehr unspezifische Symptome und wurden bei Hunden mit und ohne spezifische Antikörper gegen *B. burgdorferi* gesehen (Magnarelli et al. 1987; Cohen et al. 1990; Magnarelli et al. 1990).

1.1.1.5 Diagnose

Wie in der Humanmedizin wird die Lyme-Borreliose in der Veterinärmedizin wahrscheinlich ebenfalls überdiagnostiziert (Steere et al. 1993; Qureshi et al. 2002). Das Vorhandensein von Antikörpern lässt nur auf einen vorhergegangenen Kontakt mit den Spirochäten schliessen, ist jedoch kein Beweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen dem gezeigten Krankheitsbild und einer tatsächlichen Infektion mit Borrelien. In endemischen Gebieten sind seropositive Tiere häufig asymptomatisch, möglicherweise als Folge einer adäquaten Antwort des Immunsystems oder auch als Reaktion auf apathogene Formen oder eng verwandte Spirochäten (Arteaga et al. 1998). Deshalb sollte die Diagnose stets unter Berücksichtigung der Anamnese (Zeckenexposition) in Zusammenhang mit klinischen Symptomen, einem guten Ansprechen auf Antibiotikatherapie und einer positiven Serologie gestellt werden (Littman et al. 2005). Serologische Tests sollten eher als „seroreaktiv gegenüber *B. burgdorferi*“ betrachtet werden denn als „Test für Lyme-Borreliose“ (Sigal 1994). Kommerziell erhältliche ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) können als Screening-Test eingesetzt werden, sollten aber durch eine quantitative Messung des Antikörper-Titers oder durch einen Immunoblot abgesichert werden, um die Spezifität zu erhöhen (Greene und Straubinger 2006). Mit Hilfe des Western Blots können infizierte von geimpften Hunden unterschieden werden, weshalb er sich auch besonders als Bestätigungstest nach einem positiven Ergebnis eines ELISAs oder IFT (Immunfluoreszenztest) eignet (Greene und Straubinger 2006).

Neuere ELISAs, die OspC-Proteine verwenden, helfen die Spezifität zu verbessern. Diese können zwischen einer Infektion (OspC) und einer Impfung (OspA und OspB) unterscheiden (Greene und Straubinger 2006) (siehe 1.1.1.3).

Sichtbar gemacht werden kann *B. burgdorferi* in Körperflüssigkeiten, wie z.B. Synovia, per Dunkelfeldmikroskopie, mittels Transmissions-Elektronen Mikroskop (EM) oder in Geweben nach einer unspezifischen Silber- oder einer spezifischen immunologischen Färbetechnik (Greene und Straubinger 2006). Die Dichte in

Proben, wie z. B. Hautbiopsien, ist sehr gering (Wang 2002), weshalb Untersuchungsergebnisse häufig negativ ausfallen.

Die sicherste Nachweismethode ist die Kultur (*Barbour-Stoenner-Kelly* (BSK) *Medium*). Am erfolgreichsten ist man bei der Verwendung von Haut und kollagenreichem Bindegewebe (Faszien, Perikard, Peritoneum, Meningen, Synovialmembran) als Probematerial, möglichst aus der Nähe der Inokulationsstelle. Da Borrelien höchstens zufällig im Blut vorkommen, eignet sich dieses Material weniger zur Kultur (Straubinger et al. 1998; Callister et al. 2000).

Vor antibakterieller Therapie ist der kulturelle Nachweis zwar zeitaufwändiger, jedoch auch sensitiver als PCR. Nach antibakterieller Therapie sollten im Idealfall keine Bakterien mehr kultivierbar sein, die PCR, welche nicht zwischen toten und lebenden Bakterien unterscheidet, kann immer noch positiv ausfallen (Straubinger 2000).

1.1.1.6 Pathologische Befunde

In experimentell infizierten Hunden wurden histologisch Läsionen in Lymphknoten, Gelenken, Perikard und Haut (Appel et al. 1993), sowie in Blutgefäßen, peripheren Nerven, und Meningen (Straubinger et al. 1997; Summers et al. 2005) gefunden. Nierenschäden wurden bei experimentell infizierten Hunden nicht gefunden (Summers et al. 2005), sehr wohl jedoch in natürlich infizierten (Dambach et al. 1997). Hierbei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Nierenschäden durch eine andere Ursache ausgelöst wurden.

1.1.1.7 Therapie

Da sich eine sichere Diagnosestellung als schwierig erweist, werden Antibiotika häufig empirisch eingesetzt, in der Hoffnung so eine „therapeutische Diagnose“ zu stellen. Der klinische Erfolg nach Antibiotikagabe sollte kritisch beurteilt werden, da akute Gliedmassen- oder Gelenksprobleme häufig intermittierend sind oder ganz verschwinden unabhängig davon, ob behandelt wurde oder nicht (Magnarelli et al. 1990). Eine frühzeitige Therapie geht einher mit einer Abnahme des Antikörper-Titers und der Anzahl Borrelien im Gewebe, ausserdem kann sie als Prophylaxe dienen oder heilend bei Lahmheiten und Gelenkläsionen (Straubinger et al. 1997; Straubinger et al. 1998). Meist wird die Behandlungsdauer mit mindestens 30 Tagen angegeben. Häufig eingesetzte Antibiotika sind Amoxicillin, Azithromycin, Ceftriaxon und Doxycyclin (Greene und Straubinger 2006). Das Medikament der Wahl ist Doxycyclin, da es ein fettlösliches Tetracyclin ist. Durch die daraus folgende bessere Gewebepenetration werden niedrigere Dosierungen benötigt als bei konventionellen Tetracyclinen. Für wachsende Tiere wird Amoxicillin empfohlen, da Doxycyclin sich in Krallen, Haut und Zahnschmelz ablagert und diese verfärbt (Dotevall und Hagberg 2000).

1.1.1.8 Prophylaxe

Impfstoffe, die als Prophylaxemassnahme gedacht sind, sind in Europa wegen der Vielzahl an Genospezies nicht so sicher wie in Amerika (Keller et al. 1994). In einer Studie wurden gehäuft Nebenwirkungen nach einer Impfung gegen Borreliose beobachtet (Moore et al. 2005). Die Ursache wird hier weniger in einer

Hypersensitivitätsreaktion, als vielmehr in einer Reaktion des Immunsystems auf proinflammatorisch wirkende Oberflächenantigene gesehen. Genauere Angaben über die Art der Nebenwirkungen wurden nicht angegeben.

In Europa ist bisher ein einziger Impfstoff zugelassen: Merilym® (Merial, USA; Vertrieb: Biokema AG, Crissier-Lausanne, Schweiz), ein OspA-Impfstoff, der jedoch die Borrelien in der Zecke nicht abtötet, sondern sie am Weiterwandern aus dem Zeckendarm in die Hämolymphe hindert und somit, die Anzahl der Zecken, welche auf den Wirt übergehen können, vermindert (Greene und Straubinger 2006). Die inaktivierte Vakzine wurde aus einem französischen *B. burgdorferi* sensu strictu-Stamm entwickelt. Da in der Vakzine jedoch nur eine Spezies vertreten ist, stellt sich die Frage, ob der Impfstoff gegen die restlichen in Europa lebenden Spezies ebenfalls wirksam ist. Eine Antwort darauf wurde bis jetzt noch nicht gefunden (Liebisch und Liebisch 1999).

Am sinnvollsten und wichtigsten ist sicher die Vermeidung des Zeckenkontaktes bzw. die Verkürzung der Saugdauer der Zecke. Das wird erreicht indem die Tiere regelmässige nach dem Spaziergang abgesucht werden. Zusätzlich können Halsbänder, Spot-ons, Puder, Shampoos oder Sprays, welche akarizid wirken, eingesetzt werden. Hunde und Katzen scheinen nicht als Reservoir für den Menschen zu dienen, sondern dienen vielmehr als Indikatoren des durchschnittlichen Borrelienvorkommens in der Umgebung, da vor allem Hunde ein grösseres Expositionsrisiko als der Mensch aufweisen und somit auch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit infiziert sind (Greene und Straubinger 2006). Eine andere Studie, untersuchte Jäger mit und ohne Jagdhund, sowie Jagdhunde und Hunde, welche nicht zur Jagd eingesetzt werden serologisch auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* (Goossens et al. 2001). Hier schienen Hunde keine Rolle als Zeckenüberträger zu spielen; es fiel jedoch auf, dass beinahe gleich viele Jäger mit Jagdhunden (15%), Jäger ohne Hund (13%), Jagdhunde (18%) und Hunde, die nicht zur Jagd eingesetzt werden (16%) seropositiv waren. Der Meinung der Autoren nach bleibt der Antikörpertiter beim Mensch länger positiv als beim Hund, bei dem der Titer jedoch durch eine jährliche Reinfektion aufgefrischt wird. Den relativ hohen Anteil an serologisch positiven Jägern, sowohl mit als auch ohne Hund, führen die Autoren auf das erhöhte Expositionsrisiko (häufiger Aufenthalt im Wald) zurück. Hunde scheinen das Risiko für den Menschen, sich mit Borrelien zu infizieren, nicht zu erhöhen.

1.1.2 Glomerulonephritis

Glomeruläre Erkrankungen sind nicht nur häufig, sondern sie können auch zu chronischer Niereninsuffizienz beim Hund führen (Grauer 2005). Amyloidose und Glomerulonephritis sind die häufigsten glomerulären Erkrankungen bei Hund und Katze (Vaden 2005).

1.1.2.1 Physiologie

Das Glomerulum ist ein modifiziertes Kapillarbett, welches wie ein Filter funktioniert und so ein Ultrafiltrat des Plasmas bildet. Die Filtrationsbarriere besteht aus drei Schichten: den fenestrierten Endothelzellen, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den viszerale Epithelzellen oder Podozyten. Diese Grenze ist frei durchgängig für Wasser und kleine gelöste Stoffe, grössere Moleküle (ab ca., 60'000 bis 70'000 Dalton) werden zurückgehalten. Somit können Zellen und die meisten

Makromoleküle, wie Proteine, das Blut nicht verlassen. Heutzutage geht man davon aus, dass die negative Ladung der Filtrationsbarriere keine Rolle spielt (Schaeffer et al. 2002).

1.1.2.2 Klinische Befunde

Abhängig vom Schweregrad der Proteinurie und dem Fehlen oder Vorhandensein eines Nierenversagens variieren die klinischen Symptome (Center et al. 1987; DiBartola et al. 1989; Cook und Cowgill 1996). Es können unspezifische Symptome wie Gewichtsverlust und Lethargie oder für Nierenversagen oder Urämie spezifischere Symptome wie Polyurie, Polydypsie, Anorexie oder Erbrechen vorliegen. Bei hochgradigem Proteinverlust über den Urin können Aszites, periphere Ödeme sowie die Folgen von Thromboembolien (z.B. Dyspnoe, Verlust der Gliedmassenfunktion) das klinische Bild prägen. Häufig ist die klinische Untersuchung bei Hunden mit glomerulären Schäden unauffällig. Bluthochdruck in Zusammenhang mit Proteinurie kann zu Blindheit nach Netzhautablösung, hypertensiver Enzephalopathie mit Gleichgewichtsstörungen, Krämpfen, Bewusstseinsveränderungen und linksventrikulärer Hypertrophie des Herzens führen (Vaden 2005). Thromboembolien, als Folge des Verlusts von Antithrombin III, sind wohl die schwerwiegendsten Folgen, die glomeruläre Schäden nach sich ziehen. Da Antithrombin III in Grösse (65 000 Dalton) dem Albumin ähnelt geht es bereits in einem recht frühen Stadium der Nierenschädigung über den Urin verloren (Vaden 2005).

1.1.2.3 Labordiagnostische Befunde

Viele Tiere mit glomerulären Schäden sind asymptomatisch, die Proteinurie wird bei Routineuntersuchungen entdeckt (Vaden 2005). Proteinurie ist das Kennzeichen einer glomerulären Erkrankung. Bei Hunden wird ein UPC (Urin-Protein-Kreatinin-Quotient) $\geq 0,5$, der nicht im Zusammenhang mit einem prärenalen oder postrenalen Geschehen steht, und in 3 oder mehr Proben, im Abstand von mindestens 2 Wochen nachgewiesen wurde, als anhaltende Proteinurie gewertet (Lees et al. 2005). Einen frühen Hinweis auf eine Nierenerkrankung kann eine Mikroalbuminurie liefern. Darunter ist eine Albuminmenge von 1-30 mg pro dl Urin zu verstehen. In verschiedenen Studien (Vaden et al. 2001; Grauer et al. 2002; Lees et al. 2002) wurde festgestellt, dass eine Mikroalbuminzunahme im Urin über einen gewissen Zeitraum auf einen zukünftigen UPC-Anstieg und somit auf einen möglichen renalen Schaden hindeutet. Hypoproteinämie aufgrund von Hypoalbuminämie sieht man vor allem bei Hunden und Katzen (ca. 60-70%), welche mit schwerer Proteinurie aufgrund von Glomerulonephritis oder Amyloidose vorgestellt werden. 46% der Hunde mit Glomerulonephritis und 26% der Hunde mit Amyloidose waren nicht azotämisch (Center et al. 1987; DiBartola et al. 1989). In einer Studie (Center et al. 1987) hingegen zeigten 29% der Hunde mit Glomerulonephritis eine Isosthenurie und 37% der Hunde konnten den Harn über 1.035 konzentrieren.

1.1.2.4 Einteilung

Erworbene glomeruläre Störungen sind das Ergebnis von Schäden, hervorgerufen durch Bildung von Immunkomplexen direkt in der Niere, durch Ablagerung von Immunkomplexen in der Niere (membranöse Nephropathie, membranoproliferative Glomerulonephritis, proliferative Glomerulonephritis), oder durch nicht-entzündliche Faktoren (Amyloid), die sich negativ auf das Glomerulum auswirken. Liegt erst einmal ein glomerulärer Schaden vor, tragen Prozesse, wie z.B. die Aktivierung der Komplement- und Gerinnungskaskaden, Freisetzung von proteolytischen Enzymen, Synthese von Zytokinen oder anderen Wachstumsfaktoren und eine daraus entstehende veränderte Hämodynamik zum Fortschreiten des Schadens bei. Die genauen Mechanismen, die den Fortschritt oder den Rückgang des Nierenschadens ausmachen, sind noch unklar (Vaden 2005).

1.1.2.4.1 Glomeruläre Erkrankungen

Membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN) ist die häufigste glomeruläre Erkrankung der Hunde, die je nach Studie 20% bis 60% aller Hunde mit glomerulären Schäden betrifft (Macdougall et al. 1986; Koeman et al. 1987). Eine gesicherte Diagnose erhält man nur durch eine Nierenbiopsie, die jedoch im klinischen Alltag bisher eher selten durchgeführt wird. Somit wird das wahre Vorkommen von MPGN wahrscheinlich überschätzt (Vaden 2005). Beim Berner Sennenhund wurde sie als familiäre Erkrankung beschrieben (Reusch et al. 1994). Eine Studie berichtete von einer schnell fortschreitenden, tödlich endenden MPGN beim Golden und Labrador Retriever, die von tubulärer Nekrose und interstitieller Entzündung begleitet war und im Zusammenhang mit einer *B. burgdorferi* Infektion zu stehen schien (Dambach et al. 1997). Das durchschnittliche Alter der betroffenen Hunde betrug 5,6 Jahre. Es gibt zwei unterschiedliche Formen der MPGN: Typ I, auch mesangiokapilläre Glomerulonephritis genannt, wird häufig durch Infektionskrankheiten (Borreliose, Babesiose, Leishmaniose, Dirofilariose) ausgelöst und ist charakterisiert durch Immunkomplexablagerungen auf der subendothelialen Seite der glomerulären Basalmembran. Typ II, die intramembranöse Glomerulonephritis (dense deposit disease), wird durch Ablagerungen von noch nicht genauer bekanntem Material in der Basalmembran selbst gekennzeichnet und steht nicht im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten und scheint beim Hund selten vorzukommen (Vaden 2005). Histopathologisch stehen verdickte Kapillarschlingen und ein hyperzelluläres Mesangium im Vordergrund (Vilafranca et al. 1994; Jennette 1998; Greenberg 2001). Bezüglich der Prognose von Hunden mit MPGN kann auf Grund mangelnder Daten noch keine Aussage gemacht werden (Vaden 2005). In der Humanmedizin werden Azotämie, starke Proteinurie, Bluthochdruck und ausgeprägte tubuläre Schäden bei Vorstellung mit einer schlechten Prognose gewertet (Greenberg 2001). In einer Studie aus dem Jahr 2006, in der 40 Hunde, welche anhand von Biopsien als an Glomerulonephritis erkrankt diagnostiziert wurden, stellte sich heraus, dass es 2 Gruppen von Hunden gab: die einen (n= 19) lebten länger als 6 Monate mit einem Median von 461 Tagen, die Hunde der anderen Gruppe (n= 21) lebten weniger als 6 Monate, mit einem Median von 7 Tagen. Die einzigen Parameter, bei denen sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennen liess waren der Harnstoff, das Kreatinin- und der Hämatokrit. Je höher Harnstoff und/oder Kreatinin und je tiefer der Hämatokrit war, desto ungünstiger war die Prognose (Koirala et al. 2006).

1.1.2.4.2 Tubulointerstitielle Läsionen in Zusammenhang mit glomerulären Erkrankungen

Proteine führen durch Bildung von Proteinzyclindern und daraus folgender Verstopfung der Tubuli zu Schäden (Abrass 1997; Eddy 2001), zum anderen wirken die Proteine an sich toxisch auf die Tubulusepithelzellen, da bei vermehrtem Proteinanfall im Ultrafiltrat die Zellen der Tubuli die Proteine durch lysosomale Prozesse zu resorbieren versuchen. Die Lysosomen rupturieren und es kommt zu Zellschäden, die in der Folge zu interstitieller Entzündung, Fibrose und Zelltod führen (Vaden 2005) und zu einem fortschreitenden Verlust an Nephronen (Eddy 2001).

1.1.2.5 Therapie

Neben der ursächlichen Erkrankung sollte immer auch die Proteinurie und eine eventuell vorhandene Urämie behandelt werden (Vaden 2005).

Grauer (2005) sieht die Behandlung mit einem ACE (angiotensin-converting enzyme) –Hemmer (z.B. Enalapril) als einen der wichtigsten Eckpfeiler der Therapie. Die Proteinausscheidung wurde in einer Studie unter Enalaprilgabe signifikant gesenkt, das Fortschreiten der Azotämie konnte verzögert werden, ebenso konnte der systolische Blutdruck signifikant gesenkt werden (Grauer et al. 2000). Sobald jedoch ein systolischer Blutdruck von 170 mmHg überschritten wird sollte gezielt medikamentell, z.B. mit Amlodipin (Kalzium-Kanal-Blocker) eingegriffen werden (Vaden 2005).

Die mit den Veränderungen an den Glomeruli einhergehenden Entzündungen können durch die Gabe von niedrig dosiertem Aspirin gehemmt werden, desgleichen können durch die Verhinderung von Thrombozytenaggregation Thromboembolien vorgebeugt werden (Grauer 2005).

Als weitere unterstützende Massnahme kann eine Diät gefüttert werden, bei welcher der Gehalt an Protein vermindert, das vorhandene Protein jedoch hochwertiger ist. Das Ziel ist zum einen die Verminderung der bei der Verdauung anfallenden schädigenden Stickstoffabfallprodukte, zum anderen eine Entlastung der Glomerula durch die reduzierte Menge an filtrierbarem Protein (Kaysen 1988; Burkholder et al. 2004).

Serum Albumin und Kreatinin, Urin inklusive UPC und der Blutdruck sollten in regelmässigen Abständen kontrolliert werden (Vaden 2005).

1.1.2.6 Prognose

Die Prognose bei Glomerulonephritis ist sehr variabel und von mehreren Faktoren, nicht zuletzt von der Grunderkrankung, abhängig. Die klinische Erfahrung zeigt, dass die Erkrankung in den meisten Fällen fortschreitend ist (Grauer 2005).

1.2 Spezieller Teil

1.2.1 Borreliose und Glomerulonephritis

1987 wurden 5 Hunde beschrieben, welche nach vorhergegangenen Episoden intermittierender Lahmheit Nierenerkrankungen entwickelten (Magnarelli et al. 1987). Bei allen fünf Hunden wurden Antikörper gegen *B. burgdorferi* gefunden, bei einem von diesen fünf gelang es, *B. burgdorferi* aus Nierengewebe mittels Immunfluoreszenz zu isolieren. Ein Jahr später berichtete eine andere Studie über einen Labrador Retriever mit Glomerulosklerose und -fibrose, bei welchem Borrelien sowohl aus dem Nierengewebe mittels Immunfluoreszenz, als auch aus dem Urin mittels Immunfluoreszenz nach Kultur isoliert werden konnten (Grauer et al. 1988). Ein Zusammenhang zwischen der Nierenschädigung und dem Vorhandensein von Borrelien konnte zwar nicht bewiesen werden, es wurde jedoch spekuliert, dass sich Borrelien nicht in Nierengewebe befinden könnten, ohne eine Entzündungsreaktion hervorzurufen.

In einer weiteren Studie wurde bei BSH eine deutliche Häufung von Glomerulonephritiden (membranös, membrano-proliferativ, mesangio-proliferativ und chronisch-sklerosierend) festgestellt (Preiss 1991). Der Autor stellte eine Rüdennlinie fest, welche bei an Glomerulonephritis erkrankten BSH um einen Faktor 3 häufiger auftrat als bei gesunden BSH. Eine genetische Prädisposition konnte aufgrund des begrenzten Befundmaterials aber nicht bewiesen werden. Ein Zusammenhang von Glomerulonephritis und Borreliose beim Berner Sennenhunde wurden zum ersten Mal von Reusch (1991) beschrieben, es folgten ausführlichere Berichte (Minkus et al. 1994; Reusch et al. 1994) in denen junge BSH beschrieben wurden, welche eine membranoproliferative Glomerulonephritis aufwiesen. Ein Zusammenhang mit Antikörpern gegen Borrelien wurde diskutiert. Weitere Untersuchungen wiesen auf einen autosomal-rezessiven Erbgang als Ursache für die Glomerulonephritis hin (Reusch et al. 1994). Bei relativ jungen Labrador und Golden Retriever wurde in pathologischen Untersuchungen ein gehäuftes Auftreten von glomerulären Veränderungen gefunden, wobei immunmedierte, membranoproliferative Veränderungen überwogen (Dambach et al. 1997). Von 18 serologisch getesteten Hunden wiesen alle Antikörper gegen *B. burgdorferi* auf, bei 4 Hunden wurden in Nierengewebe mit Hilfe einer Silberfärbung Spirochäten nachgewiesen, welche in Zusammenhang mit den Nierenveränderungen gebracht wurden. Bei Untersuchungen an Beagles konnte kein Zusammenhang zwischen den rasch fortschreitenden Nierenschäden und Borreliose hergestellt werden, was die Autoren auf die Rasse (Beaglehunde, keine Labrador oder Golden Retriever) bzw. das Alter der Tiere (6, bzw. 11 Wochen) zurückführten (Summers et al. 2005). In einer anderen Studie wurde mittels PCR bei 2 Hunden *B. burgdorferi* aus Nierengewebe nachgewiesen. Bei einem der beiden Hunde wurde die immunhistochemische Untersuchung der Nieren als möglicherweise leicht positiv gegen *B. burgdorferi* beurteilt (Shanies et al. 2005). Bei beiden Hunden waren vorher durch Western Blot und/ oder C₆-ELISA Borrelien-Antikörper festgestellt worden. Da jedoch Borrelien nur in wenigen Nieren der insgesamt 17 untersuchten Hunde nachgewiesen werden konnten, wurde ein Immunkomplexgeschehen als wahrscheinlicher pathologischer Mechanismus angenommen. Hunde mit genetisch bedingtem Mangel an Komplementfaktor C3 zeigten vermehrtes Vorkommen von Nieren- und Infektionskrankheiten (Blum et al. 1985). Ein C3- Mangel konnte jedoch bei BSH bereits ausgeschlossen werden (Gerber et al. 2006). In einer Studie (Eichenberger 2005) mit 161 Berner Sennenhunden und 62 Hunden anderer Rassen an der Klinik

für Kleintiermedizin der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich wurde der Frage nachgegangen, ob Berner Sennenhunde häufiger Antikörper gegen *B. burgdorferi* aufwiesen, und ob gesunde Berner Sennenhunde häufiger frühe Anzeichen einer glomerulären Erkrankung zeigten. Es konnte gezeigt werden, dass 59% der BSH, aber nur 18% der Kontrollhunde Antikörper gegen *B. burgdorferi* aufwiesen (Gerber et al. 2004). Es konnte keine Erklärung für diesen Unterschied gefunden werden. Die Untersuchung der Proteine im Urin ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen BSH und Kontrollhunden (Eichenberger und Gerber 2003). Was jedoch auffiel war, dass 12 (40%) von 30 Hunden, die im Zeitraum der Studie an der Klinik für Kleintiermedizin der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich mit Proteinurie vorgestellt wurden BSH waren. Auch hier hatten die BSH häufiger Antikörper gegen *B. burgdorferi* (43%) als Hunde anderer Rassen (19%).

1.2.2 Verlaufsuntersuchungen

In einem humanmedizinischen Artikel, der eine Verlaufsstudie beschrieb, wurde der Langzeitverlauf von Menschen mit Erythema Migrans nach Antibiotikatherapie als sehr gut bezeichnet (Nowakowski et al. 2003). Eine andere Studie beschrieb häufig Symptome, wie sie für Borreliose typisch sind (Gelenks- oder Muskelschmerzen, Müdigkeit, Gefühllosigkeit, geschwollene Gelenke) bzw. Probleme im Alltag (bei der Benennung von Gegenständen, bei der Hausarbeit, beim Sport, beim Schlafen) bei Menschen, die 1 bis 11 Jahre nach Diagnose befragt wurden. Allerdings unterschied sich die Häufigkeit der angegebenen Symptome nicht im Vergleich zu jeweils altersgleichen Kontrollgruppen ohne Borreliose-Anamnese (Seltzer et al. 2000). Leider beschränkten sich die Nachverfolgungen der Patienten in der Humanmedizin teilweise auf eine reine anamnestische Erhebung der klinischen Symptome, ohne erneute serologische Untersuchungen (Seltzer et al. 2000; Lipsker et al. 2002) oder sie wiesen von vornherein keine einheitlichen Untersuchungsschemata auf (Shadick et al. 1994). Bei den Studien, bei denen eine wiederholte serologische Untersuchung durchgeführt wurde, zeigte sich, dass deutlich weniger Personen klinische Symptome aufwiesen, als man anhand der serologischen Ergebnisse erwarten würde, das heisst es wiesen mehr Personen eine positive Borrelien-Serologie auf als Symptome (Fahrer et al. 1991; Vos et al. 1994; Fahrer et al. 1998). In einer Studie mit 950 untersuchten Personen zeigten 9 (0.95%) klinische Anzeichen (Meningitis, Poly-/Arthritis, Erythema Migrans) und waren serologisch positiv (IgG ELISA) (Fahrer et al. 1991).

In der Veterinärmedizin stammen die meisten Verlaufsuntersuchungen aus den USA. In einer Studie aus dem Jahr 1990 wurden Hunde aus Gebieten, in denen Lyme-Borreliose endemisch vorkommt serologisch verfolgt (Magnarelli et al. 1990). Es konnten jedoch sowohl bei den Hunden, die Lahmheiten oder Gelenkserkrankungen zeigten als auch bei denen, die als gesund galten, nur geringfügige Veränderungen der Antikörpertiter festgestellt werden. Eine Behandlung mit Antibiotika (Tetracyclin oder Doxycyclin) schien keinen Einfluss auf das serologische Ergebnis zu haben. In einer anderen Studie konnte bei Beagles auch noch bis zu 600 Tage nach Infektion mit *B. burgdorferi* DNA mittels PCR aus Hautbiopsien nachgewiesen werden (Straubinger et al. 2000). Es wurde ausserdem festgestellt, dass nach Antibiotikabehandlung (Ceftriaxon, Azithromycin oder Doxycyclin) die Antikörpertiter sanken, selbst nach Prednisolongabe konnte bei den mit Antibiotika vorbehandelten Hunden keine Änderung des Titers festgestellt werden. Hunde, die nicht vorbehandelt waren wiesen nach Prednisolongabe eine positive Kultur auf und

zeigten geschwollene Gelenke, sowie Lahmheit. Eine in Europa durchgeführte Studie über 3 Jahre zeigte, dass die meisten Hunde der Studie nach ihrem erstmaligen Zeckenkontakt eine Antikörperantwort gegen *B. burgdorferi* sensu lato ausbildeten, die in den Folgejahren, möglicherweise durch eine Reinfektion, stimuliert wurde (Hovius et al. 1999).

1.3 Ziele

Eine dieser Arbeit vorangegangene Studie hat gezeigt, dass BSH signifikant häufiger Antikörper gegen *B. burgdorferi* aufwiesen als Hunde anderer Rassen (Eichenberger 2005). Ein Zusammenhang zwischen Borreliose und Glomerulonephritis, wie in anderen Studien beschrieben, konnte in der vorangegangenen Studie nicht gezeigt werden. Unklar blieb, ob das gehäufte Vorkommen von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* bei BSH einen Einfluss auf das gehäufte Vorkommen von Glomerulonephritis hat.

Mit Hilfe dieser Studie sollte nun, nach 2-3 Jahren, die in der Vorstudie untersuchten Hunde erneut auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* und Proteinurie untersucht werden. Die Daten sollten mit denjenigen der Vorstudie verglichen werden, um den Einfluss von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* auf das Vorkommen von Proteinurie beurteilen zu können.

2 Material und Methode

Die Genehmigung des Tierversuchs erfolgte am 22.04.2005 durch das Kantonale Veterinäramt Zürich unter der Versuchsnummer 60/2005, gültig bis zum 31.05.2006.

2.1 Hunde

Die untersuchten Hunde hatten alle an einer Vorstudie teilgenommen. Die Berner Sennenhunde waren zum Zeitpunkt der Vorstudie mindestens 4 Monate alt und waren reinrassig mit Abstammungspapieren. Die Kontrollhunde waren Hunde grosser, langhaariger Rassen, die zum Zeitpunkt der Vorstudie ebenfalls mindestens 4 Monate alt waren. Da seit der Erstuntersuchung teilweise bis zu 3 Jahren vergangen waren, geschah die erste Kontaktaufnahme wie bereits in der ersten Studie über den Schweizerischen Klub für Berner Sennenhunde und den Schweizerischen Neufundländer und Landseer Klub. Im Rahmen einer Züchtertagung wurden interessierte Berner Sennenhund-Züchter und -Halter auf dieses Folgeprojekt aufmerksam gemacht. In der Zeitschrift HUNDE (06/2005), unter der Rubrik „Blässi-Post“ erschien ein Hinweis auf die Fortsetzung des Projekts mit einer kurzen Beschreibung (Gerber 2005). Des Weiteren wurden die Besitzer persönlich angeschrieben; später wurde telefonisch ein Besuchstermin vereinbart, die Probenentnahme erfolgte bei den Tierhaltern zuhause.

Zur weiteren Auswertung wurden die Hunde, sowohl BSH als auch Kontrollhunde, nach den Ergebnissen der vorhergegangenen Studie in folgende Gruppen eingeteilt:

- Antikörper positive Hunde mit Proteinurie
- Antikörper negative Hunde mit Proteinurie
- Antikörper positive Hunde ohne Proteinurie

- Antikörper negative Hunde ohne Proteinurie.

Ein Protein-Kreatinin-Quotient im Urin von > 0.3 wurde als Proteinurie bezeichnet. Antikörper positiv bedeutete, dass Antikörper gegen *B. burgdorferi* sowohl im ELISA als auch im Westernblot nachgewiesen wurden.

Geplant war die erneute Untersuchung aller Hunde, die in der ersten Studie durch Proteinurie aufgefallen waren. Zusätzlich wurde dieselbe Anzahl BSH ohne Proteinurie wie mit Proteinurie und ebenfalls dieselbe Anzahl Kontrollhunde ohne Proteinurie wie BSH mit Proteinurie untersucht.

Waren die Hunde in der Zwischenzeit verstorben, wurden die Besitzer nach dem Todesalter sowie nach der Ursache befragt. Die Todesursache wurde als gesichert beurteilt, wenn eine schriftlicher Pathologie- oder Zytologiebericht vorlag. Diese wurden zum Teil von den Besitzern selbst oder nach Kontaktaufnahme von den behandelnden Tierärzten erhalten.

2.2 Probenmaterial

Den Hunden wurde 20 ml Blut entweder aus der Vena jugularis oder der Vena cephalica entnommen. Die Zystozentese (10 ml Urin) erfolgte unter Ultraschallkontrolle mit Hilfe eines tragbaren Ultraschallgeräts (50S Tringa Vet, 5.0 / 7.5 MHz, PIE Medical Equipment BV, Maastricht, Niederland). Des Weiteren wurden die Besitzer gebeten einen Fragebogen auszufüllen, mit Fragen nach dem Gesundheitszustand, der Impf- und Zeckenprophylaxe, dem Zeckenvorkommen und nach einem möglichem Auslandsaufenthalt (Tabelle 10). Durch den Fragebogen sollte die Interpretation der Laborergebnisse, vor allem bei möglichen Abweichungen vom Referenzbereich, erleichtert werden. Aus der ersten Untersuchung waren die Abstammungsdaten bereits bekannt.

2.2.1 Probenentnahme

Das Blut wurde sofort nach Entnahme in EDTA-, sowie in Serumröhrchen gegeben. Der Urin wurde in ein steriles Röhrchen sowie in ein unsteriles Röhrchen aufgeteilt. Das Material wurde bei 0 bis 5°C gekühlt und vor Lichteinfall geschützt in einer Kühlbox transportiert. Das EDTA-Blut wurde bei Umgebungstemperatur transportiert, um die Thrombozytenaggregation nicht zu beschleunigen. Innerhalb von 2-10 Stunden wurden Blutaussstriche angefertigt, das Serum abzentrifugiert und eine Harnkultur angelegt. Die endgültige Verarbeitung erfolgte spätestens am darauf folgenden Tag, bis dahin wurde das Material bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.2 Weiterverarbeitung des Probenmaterials

Das nach Durchführung des Chemieprofils überschüssige Serum wurde bei -80°C eingefroren. Ebenso wurde der nach Durchführung der Urinanalyse überschüssige Urin bei -80°C tiefgefroren, zu einem späteren Zeitpunkt wurde zusätzlich ein Mikroalbuminurietest und eine SDS-AGE (Natrium-Dodecyl-Sulfate-Agarose-Gel-Elektrophorese) durchgeführt.

Die Borrelien-Serologie wurde mittels zweier unterschiedlicher ELISAs durchgeführt, ergänzt durch einen Western Blot.

2.2.2.1 Hämatologie, Blutchemie

Der Hämatokrit, das Hämoglobin (photometrische Messung, 546 nm, nach Hämolyse) und die Gesamtleukozytenzahl wurde mittels elektronischen Zellzählgerät (Cell-Dyn 3500 Hämatologie-Analyzer, Abbott, Baar, Schweiz) bestimmt. Mit demselben Gerät wurde auch das Differenzialblutbild erstellt, zusätzlich zur Auszählung eines mit Wright-Färbung (= Gemisch aus Giemsa und May-Grünwald) gefärbten Blutaussstrichs (zweimal hundert Zellen).

Das Serum wurde durch Zentrifugation (10 Minuten, 3000 U/min) gewonnen und mit einem automatischen Analysegerät (Cobas-Integra® 400plus, bzw. 800-Analyzer für klinische Chemie: Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) untersucht. Folgende Werte wurden bestimmt: Bilirubin, Glukose, Harnstoff, Kreatinin, Protein, Albumin, Cholesterin, Alkalische Phosphatase, Amylase, ASAT, ALAT, Natrium, Kalium, Kalzium und Phosphor.

2.2.2.2 Urinanalyse

Der Urin wurde mittels Teststreifen (Combur10-Test®, Boehringer Mannheim, Deutschland) untersucht. Die Auswertung erfolgte durch das automatische Harnanalysegerät Mditron® Junior II (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz). Die Gewinnung des Sediments erfolgte durch Zentrifugation bei 1500 U/min während 5 Minuten. Die folgende Untersuchung bei 400-facher Vergrößerung beinhaltete die Suche nach Erythrozyten, Leukozyten, Epithelzellen und Kristallen. Das Protein für den Urin-Protein-Kreatinin-Quotienten (UPC) wurde mit einem automatischen Analysegerät (Cobas-Integra® 400plus, bzw. 800-Analyzer für klinische Chemie; Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) mittels kolorimetrischer Methode mit dem Pyrogallolrot Molybdat-Komplex bestimmt, das Kreatinin mit demselben Gerät mittels gepufferter kinetischer Jaffé-Reaktion ohne Deproteinisierung. In unserer Studie wurde ein UPC > 0.3 als Proteinurie definiert. Dieser Wert, der tiefer ist als der im 2004 ACVIM Consensus Statement (Lees et al. 2005) vorgeschlagene Wert von ≥ 0.5 wurde in der Vorgängerstudie ausgehend von den UPC-Werten der 62 im Feld untersuchten Kontrollhunde, als Bereich zwischen der fünften und der fünfundneunzigsten Perzentile berechnet (Eichenberger 2005).

2.2.2.3 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) für Borrelien

Es wurden zwei unterschiedliche ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Borrelien eingesetzt: der ELISA aus dem Institut für Veterinärbakteriologie, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich (Wittenbrink et al. 1996) und der kommerziell erhältliche ELISA SNAP®₃Dx™ (IDEXX, Provet AG, Lyssach, Schweiz), der nur zum Vergleich mitgeführt wurde.

Als Borreliose-positiv wurde ein Hund gewertet, wenn er sowohl im ELISA (nach Wittenbrink) als auch im Western Blot positiv war. Als negativ wurde er gewertet, wenn er im ELISA negativ war (unabhängig vom Western Blot-Ergebnis), oder wenn er im ELISA positiv war, im Western Blot jedoch negativ. Diese Kombination stellte auch unseren Goldstandard für den Vergleich mit dem ELISA SNAP®₃Dx™ dar.

2.2.2.3.1 Borrelien-ELISA nach Wittenbrink

Nach dem Auftauen wurden zur Entfernung kreuzreagierender Antikörper vor Durchführung des eigentlichen ELISA die Serumproben mit einem Gemisch aus formalininaktivierten Bakterien absorbiert. Das Bakteriengemisch enthielt etwa 10^8 Bakterien je ml und bestand aus folgenden in Reinkulturen vermehrten Bakterien: 18 *Leptospira* (L.) Serovaren (sv.: *L. interrogans* sv: *australis*, *bratislava*, *lora*, *münchen*, *autumnalis*, *bataviae*, *canicola*, *grippotyphosa*, *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *copenhageni*, *pomona*, *pyrogenes* und *saxkoebing*. *L. borgpetersenii* sv: *ballum*, *hardjo*, *sejroe* und *tarassovi*), *Salmonella typhimurium*, *Brachispira hyodysenteriae*, *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*. Zur Absorption wurden 50 µl Serum mit 50 µl des Bakteriengemisches in einem 1.5 ml-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschliessend wurden die Bakterien durch Zentrifugation entfernt; der Überstand wurde im ELISA untersucht. Absorbierte und nicht-absorbierte Seren wurden im Doppelansatz auf derselben ELISA-Platte getestet.

Als Antigen wurde ein ganz-Zell-Sonikat aus Reinkulturen der vier in Mitteleuropa am häufigsten nachgewiesenen Genospezies (*B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) B 31 (ATCC 35210), *B. garinii* N34, *B. afzelii* VS461 und *B. valaisiana* VS116) verwendet. Die Bakterien wurden in Barbour-Stoenner-Kelly-II-Medium (BSK-II) bei 34°C vermehrt (Barbour, 1984). Aus hochgradig bewachsenen Kulturen wurden die Borrelien durch Zentrifugation (1500 x g, 20 min) abgetrennt und durch dreimaliges Waschen in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; 136,9 mM NaCl; 1,46 mM KH_2PO_4 ; 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 2,7 mM KCl; pH 7,4) von Residuen des BSK-II gereinigt. Anschliessend wurde für jede Präparation der Proteingehalt bestimmt (Lowry et al. 1951). Gleiche Proteinkonzentrationen der vier Antigene wurden gemischt, durch Ultraschallbehandlung homogenisiert und in 1-ml Aliquots bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

Mikrotiterplatten (Microton 655001, Greiner bio one, Nürtingen, Deutschland) wurden über Nacht bei 4°C mit Antigen (350 ng/ml) Borrelienantigen in Karbonat-Bikarbonat Puffer (15,0 mM Na_2CO_3 ; 35,0 mM NaHCO_3 ; 3,0mM NaN_3 ; pH 9,6) beladen (100 µl/Kavität). Die Platten wurden entleert und dreimal in einem automatischen Waschgerät (Atlantis, ASYS, Vitaris, Baar, CH) gewaschen. Als Wasch- und Verdünnungsflüssigkeit diente PBS pH 7,4 mit Zusatz von 0,05% TWEEN®20 (Brunschwig, Basel, Schweiz). Die weiteren Inkubationen der Mikrotiterplatten erfolgten bei Raumtemperatur 1h auf einem Schüttler mit ca. 200 U/min. Nach jeder Inkubation wurden die Platten dreimal gewaschen. Die Absättigung freier Bindungsstellen erfolgte mit Blockingpuffer (PBS+1,0% Proteose-Pepton; 200 µl/Kavität; 1 h Inkubation). Die Testseren wurden 1:100 verdünnt und jeweils im Doppelansatz gegen das Borrelienantigen getestet (100 µl/Kavität). Zur Detektion gebundener Antikörper wurde Meerrettichperoxidase-konjugiertes Kaninchen-anti-Hund-IgG (H+L) (Sigma, Diesenhofen, Schweiz) in einer Verdünnung von 1:10'000 verwendet (100 µl/Kavität). Gebundene Enzymaktivitäten wurden über den Umsatz von ABTS (2,2-Azino-di[3-ethyl-Benzthiazolinsulfat], Sigma, Diessenhofen, Schweiz) in 0,1 M Zitratpuffer pH 4,2 + 0,03% (vol/vol) H_2O_2 nachgewiesen (100 µl/Kavität). Der Substratumsatz wurde bei 405 nm in einem computergesteuerten Mehrkanalphotometer gemessen (Spect 2 Millenium, Tecan, Männedorf, CH), nachdem der Substratumsatz der Positivkontrollen eine optische Dichte (OD_{405}) von 0,8-1,0 erreicht hatte (\varnothing 25-30 min Inkubation).

Die erste Vertikalreihe jeder Mikrotiterplatte enthielt nur Substrat (Blank-Reihe). Des Weiteren wurden Serumkontrollen (ohne Antigen) und Antigen-Konjugatkontrollen für beide Antigene durchgeführt. Auf jeder ELISA-Platte wurden positive Kontrollseren (Serum von Hunden nach Immunisierung mit *B. burgdorferi* ss.) und negative Kontrollseren mitgeführt (Blutserumproben von 33 Laborhunden ohne Exposition zu Zecken). Von den 33 Negativkontrollseren wurden für jeden Test acht Seren willkürlich ausgewählt und zur Ermittlung des Grenzwertes (cut-off) mitgeführt. Die Berechnung des cut off erfolgte aus den Messwerten der seriellen Untersuchungen der Negativkontrollseren nach der Formel von Tjissen (Tjissen 1985) auf dem Signifikanzniveau von $p < 0,01$. Die Präzision des ELISA wurde durch Berechnung der Intra- und Interassayvarianz aus ELISA-Daten der positiven Kontrollseren nach Chan und Perlstein (1987) ermittelt: Intraassay-Varianz für den Borrelia-ELISA ausgedrückt als Variationskoeffizient von 10 nacheinander durchgeführten Messungen: 7,4%; Interassay-Varianz: 9,2%. Beide Werte liegen deutlich unter dem zulässigen Maximalwert von 15% (Chan und Perlstein 1987). Der OD-Wert (optical density) ergab sich aus der Berechnung des Mittelwerts der gepaart untersuchten Serumproben (jeweils nicht-präadsorbiert und präadsorbiert).

2.2.2.3.2 SNAP[®]_{3Dx}[™] - C₆-ELISA

Der SNAP[®]_{3Dx}[™] ist ein Praxis-Test, der das verwendete Serum oder Vollblut gleichzeitig auf *B. burgdorferi*- und *Ehrlichia canis*-Antikörper sowie auf *Dirofilaria immitis*-Antigen untersucht. Das synthetische C₆ Peptid wurde an bovines Serum Albumin (bSA) und Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) nach Standardmethoden konjugiert (Hashida et al. 1984). Das bSA-Peptid-Konjugat (0,5 bis 2,5 µl) wurde punktförmig an eine vorher genau determinierte Stelle auf eine poröse Polyethylen-Matrix verbracht. Das HRP-C₆-Peptid-Konjugat war in einem Konjugat-Verdünnungsmittel enthalten, welches zusätzlich aus HRP-anti-Herzwurm-Konjugat, HRP-*E. canis*-Peptid-Konjugat, unspezifischen Proteinen und Waschlösung bestand.

Vor der Testdurchführung wurden die bei -80°C gelagerten Proben auf Zimmertemperatur gebracht und zentrifugiert (3000 U/min, 5 min). Der Test wurde wie in der Testanleitung beschrieben durchgeführt und nach 8 Minuten optisch abgelesen. Das Testergebnis lautete negativ oder positiv (siehe Abbildung 1).

2.2.2.4 Western Blot für Borrelien

Die Blutserumproben der Hunde wurden zusätzlich mit einem IgG Western Blot untersucht (Virion Ltd., Rüschlikon, Schweiz).

Der Test enthält Western Blot-Streifen mit definierten Partialantigenen von *B. burgdorferi* ss und *B. afzelii*. Der Test wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach den Vorgaben von Hauser (Hauser et al. 1997). Für die Untersuchung von Hundeseren wurden in Vorversuchen mit positiven und negativen Kontrollseren (siehe Abschnitt 2.2.3.3) eine Serumverdünnung von 1:200 und eine Konjugatverdünnung von 1:2000 ermittelt (Alkalische-Phosphatase-Kaninchen-anti-Hund IgG, H+L, Sigma, Diessenhofen, Schweiz).

Das Ablesen der Banden erfolgte optisch, wobei eine mögliche geringgradige Ungenauigkeit bei der Interpretation der Stärke und der Lage der Banden nicht

ausgeschlossen werden konnte. Alle Streifen wurden von einer Person zusammen ausgewertet. Die Lage der Banden auf den Streifen, und somit ihre Spezifität, wurde anhand eines mitgeführten Kontrollstreifens beurteilt, die Stärke der Banden wurde anhand eines für jede Inkubationsreihe mitgeführten Cut-off-Streifens ermittelt. Banden, die nicht mindestens die Stärke der Bande des Cut-off-Streifens aufwiesen wurden nicht berücksichtigt (siehe Abbildung 2).

Als positiv wurde der Hund beurteilt, wenn mindestens eine Bande im Bereich 83 kDa (p100), 58 kDa (p58), 25 kDa (OspC), 21 kDa (p21) oder 18 kDa (p17) vorhanden waren. Ebenfalls als positiv wurde der Streifen bewertet, wenn mindestens zwei Banden im Bereich 45 kDa, 39 kDa (BmpA) oder 30 kDa vorhanden waren. Banden im Bereich 75 kDa (Hsp–Heat shock protein), 60 kDa (Hsp60), 41 kDa (Flagellin), 34 kDa (OspB), 31 kDa (OspA), 29 kDa (OspD), 22 kDa oder 19 kDa (OspE) wurden nicht berücksichtigt.

2.2.2.5 Bakteriologische Untersuchung der Harnproben

Von jeder steril entnommenen Harnprobe wurde eine Kultur angelegt. Dazu wurden Columbia Agar mit 5% Schafblut (PB5039A, Fa. Oxoid, Basel) und Gassner-Medium (O5021A, Fa. Oxoid, Basel) beimpft und während 48 h bei 37 °C in aerober Atmosphäre inkubiert und täglich abgelesen.

Von jeder Harnprobe wurde ein Hemmstoffnachweis auf Testagar pH 6,0 (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit Zusatz von 0,1% *Bacillus subtilis* Suspension (Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 12-24 h bei 37 °C in aerober Atmosphäre wurden die Resultate abgelesen und Proben mit Radiushemmzonen von ≥ 4 mm als Hemmstoff positiv bewertet. Zusätzlich wurde von jeder Harnprobe ein Objektträgerausstrich zur mikroskopischen Beurteilung angefertigt und nach Gram gefärbt.

Mussten ausserhalb der Arbeitszeiten des Labors Urinkulturen angelegt werden geschah dies 2-8 Stunden nach Probenentnahme. Urotubes™ (CLED-, MacConkey- und Cetrimid Agar; Becton Dickinson, Maryland, USA) wurden mit 2-3 ml sterilem Urin begossen, über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert und am darauf folgenden Tag während 48 Stunden bei 37 °C in aerober Atmosphäre inkubiert. Ätiologisch relevante Bakterienspezies wurden nach standardisierten Methoden biochemisch differenziert (Quinn et al. 1994). Die in-vitro Empfindlichkeitsprüfung dieser Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen wurde gemäss NCCLS-Richtlinien durchgeführt.

2.2.2.6 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Agarose-Gel-Elektrophorese (SDS-AGE)

Die Harnproteine wurden mittels SDS-AGE auf Hydragel 5 Proteinurie® Agarosegel (SEBIA, Issy-les-Moulineaux, Frankreich) entsprechend ihrer Molekularmasse aufgetrennt.

Die Urinproben wurden für die Elektrophorese einzeln in die Vertiefungen des Agarosegels gegeben (5 Vertiefungen pro Gel). In die erste Vertiefung wurde jeweils eine Kontrolle (Molekulargewichtsmarker: Lysozym 14.3 kDa, Triosephosphat-Isomerase 26.6 kDa, Rinderserumalbumin 66 kDa und menschliches IgG 150 kDa) gegeben. Die elektrophoretische Migration, das Trocknen, Färben, Entfärben und Endtrocknen wurde automatisch durch das Hydrasys® System (SEBIA, Issy-les-Moulineaux, Frankreich) durchgeführt. Die Resultate der gefärbten Agarosegele

wurden anhand der mitgeführten Kontrolle, durch 2 Personen unabhängig voneinander, optisch ausgewertet. Dabei wurde folgende Einteilung vorgenommen: Keine Bande oder eine schwache Bande im Bereich von 66 kDa wurden als physiologisch beurteilt. Banden im Bereich > 66 kDa und starke Banden im Bereich von 66 kDa wurden als glomeruläre Proteinurie Banden im Bereich < 66 kDa als tubuläre Proteinurie und Banden in beiden Bereichen als gemischte Proteinurie interpretiert. Eine Bande im Bereich von 30 kDa wurde als Argininesterase interpretiert. Argininesterase ist bei nicht-kastrierten Rüden zu finden, und stammt aus dem Prostatasekret (Teinfalt et al. 2000).

2.2.2.7 Mikroalbuminurietest

Zum Nachweis von tiefen Albumin-Werten im Urin wurde der Immunoassay E.R.D.-HealthScreen™-Test (HESKA®, Fribourg, Schweiz) eingesetzt, der bereits Albuminkonzentrationen ab 1 mg/dl im Urin nachweisen kann. Der Test wurde mit Hilfe verschiedener Studien validiert (Jensen et al. 2001; Pressler 2001; Vaden et al. 2001; Grauer et al. 2002; Lees et al. 2002; Pressler et al. 2003; Radecki et al. 2003). Für die Testdurchführung wurde 1 ml Urin in ein Teströhrchen gegeben und auf ein einheitliches spezifisches Gewicht (1.010) gebracht. Proben, welche von sich aus ein tieferes spezifisches Gewicht hatten wurden nicht weiter verdünnt. Nach dem Mischen der Verdünnung wurde das gebrauchsfertige Test-Kit ins Röhrchen gegeben und nach ca. 3 Minuten, spätestens nach 40 Minuten, das Testresultat anhand der Anleitung der Firma HESKA®, visuell abgelesen. Die Resultate lauteten stark, mittel oder leicht positiv und negativ.

2.3 Statistik

Die labordiagnostischen Daten, sowie die Antworten aus dem Fragebogen wurden mit Hilfe des Statistik-Programmes SPSS (Statistical Package for the Social Science, Software Pakets für Windows Version 11, SPSS Inc., Chicago II, USA) erfasst und mit nicht-parametrischen Tests ausgewertet. Die unabhängigen Parameter wurden mittels Mann-Whitney-U-Test und Chiquadrat-Test verglichen, die abhängigen mittels Wilcoxon-Test. Die Signifikanzgrenze wurde bei $p < 0.05$ festgelegt.

3 Resultate

3.1 Hunde

Insgesamt wurden 145 Hunde (83 BSH; 62 Kontrollhunde) rückverfolgt. Zu 22 bestand kein Zugang mehr, weil die Besitzer entweder umgezogen waren, oder weil die Besitzer kein weiteres Interesse an einer Studienteilnahme hatten; geringes Interesse bestand vor allem bei den Besitzern der Kontrollhunde, Berner Sennenhund-Besitzer waren häufiger bereit erneut teilzunehmen. 40 Hunde waren verstorben und 83 konnten erneut untersucht werden (siehe Tabelle 1). Eine Übersicht hinsichtlich des serologischen Status und der Proteinausscheidung bei der Erstuntersuchung von den Hunde zu denen kein Zugang mehr bestand sind in Tabelle 2 aufgeführt.

3.2 Verstorbene Hunde

Von den insgesamt 145 nachverfolgten Hunden waren 40 (28%) verstorben (siehe Tabelle 1).

Eine Übersicht hinsichtlich des serologischen Status und der Proteinausscheidung bei der Erstuntersuchung der verstorbenen Hunde ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

Die Rasseverteilung ist aus Tabelle 4 ersichtlich.

BSH waren im Median 6 (Bereich 1 bis 11) Jahre und Kontrollhunde 8 (1 bis 12) Jahre alt. Es bestand kein signifikanter Unterschied im Todesalter der beiden Gruppen (Abbildung 3).

Durch Sektion oder zytologische Untersuchungen von Geweben konnte nur bei 8 (20%) der 40 Hunde eine Todesursache gesichert werden (Tabelle 5). Die gesicherte Diagnose „Glomerulonephritis“ konnte nur bei einem Hund, einem serologisch-positiven BSH mit einem UPC > 0.3, gestellt werden. Bei den restlichen 32 (80%) mussten wir uns auf die Aussage der Besitzer verlassen (Tabelle 6).

Unter den verstorbenen Hunden wiesen signifikant mehr BSH als Kontrollhunde in der Vorstudie eine positive Borrelien-Serologie auf (siehe Tabelle 7).

Die beiden Gruppen, die verstorbenen und besuchten Hunde, unterschieden sich nicht signifikant im Hinblick auf das Vorkommen von Antikörpern gegen Borrelien bei der ersten Untersuchung. Die verstorbenen Hunde wiesen aber signifikant häufiger ein UPC > 0.3 auf als die besuchten.

3.3 Besuchte Hunde

Eine Übersicht hinsichtlich des serologischen Status und der Proteinausscheidung in der Vorstudie ist aus Tabelle 8 ersichtlich.

Alter, Geschlecht und Farbe der untersuchten BSH und Kontrollhunde sind in Tabelle 9 angegeben.

Von 3 Hunden konnte kein Urin gewonnen werden, da die Harnblase zum Zeitpunkt der Untersuchung leer war.

3.3.1 Untersuchungsabstand

Der Untersuchungsabstand betrug im Median 992 Tage mit einem Bereich von 899 Tagen bis 1113 Tagen. Bei den BSH betrug der mediane Untersuchungsabstand 1021 Tage (Bereich: 907-1113 Tage) und bei den Kontrollhunden 969 Tage (Bereich: 899-1019 Tage). Der Untersuchungsabstand der BSH war signifikant kürzer als der der Kontrollhunde.

3.3.2 Geographische Verteilung der im Feld untersuchten Hunde

Die geographische Verteilung der Hunde ist in Abbildung 5 zu sehen. Die Hunde stammten ausschliesslich aus der deutschsprachigen Schweiz, mit Schwerpunkt im Kanton Bern. Die BSH und die Kontrollhunde stammen aus ähnlichen Regionen.

3.3.3 Anamnese der erneut untersuchten Berner Sennenhunde und Kontrollhunde

Von den Besitzern wurde ein Fragebogen mit Fragen zum allgemeinen Gesundheitszustand, zum Impfstatus, zur Zeckenprophylaxe und Zeckenhäufigkeit ausgefüllt. Die Antworten sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Es fiel auf, dass bei 24 BSH (45% der BSH) kein Zeckenschutz eingesetzt wurde, während alle Kontrollhunde mit einem Zeckenschutz behandelt wurden. Bei 3 BSH und 5 Kontrollhunden wurde als Allgemeinzustand „Alter Hund“ angegeben. 4 BSH und 8 Kontrollhunde hatten eine herabgesetzte Kondition. Bei je 4 BSH und Kontrollhunden wurde eine Lahmheit angegeben, bei je 1 BSH und 1 Kontrollhund wurde als genauere Lahmheitsursache Arthrose angegeben. Bei allen Hunden war die Wasseraufnahme für ihre Besitzer normal, bei einem Kontrollhund wurde ein vermehrter Harnabsatz angegeben. Keines der Tiere hatte Ödeme.

Kontrollhunde (14/30, 47%) waren statistisch gesehen häufiger im Ausland als BSH (9/51, 18%). Von 2 BSH fehlen die Angaben.

3.3.3.1 Vergleich mit der vorhergehenden Studie

In der vorhergegangenen Studie wurde bei 12 BSH (14%) und bei 3 Kontrollhunden kein Zeckenschutz eingesetzt, was sich als nicht signifikanter Unterschied im Vergleich zur vorliegenden Studie erwies. Bei allen Hunden war als Allgemeinzustand und Kondition noch „normal“ angegeben worden in der vorhergehenden Studie. Bei 1 BSH und bei 2 Kontrollhunden wurde in der Vorstudie eine Lahmheit angegeben, der BSH hatte laut Besitzerangaben in der Folgestudie keine Lahmheit mehr, die beiden Kontrollhunde wiesen hingegen immer noch eine Lahmheit auf. 1 Kontrollhund litt damals bereits unter Arthrose. Bei allen Hunden war die Wasseraufnahme normal, bei einem BSH wurde ein verminderter Harnabsatz angegeben. Von 9 BSH und 3 Kontrollhunden fehlten Angaben. Es liess sich kein Zusammenhang zwischen Lahmheit und Borreliose-Antikörpern herstellen.

3.3.4 Hämatologie und Blutchemie der untersuchten Berner Sennenhunde und Kontrollhunde

Die Ergebnisse der hämatologischen und chemischen Blutuntersuchung sind in Tabelle 11 und Tabelle 12 zusammengefasst. Die einzelnen azotämischen Hunde, alles BSH, aus beiden Studien sind in Tabelle 13 aufgeführt (Vorstudie Harnstoff Median: 10,1 mmol/l (Bereich 7,1-13,1 mmol/l), Kreatinin Median: 109 µmol/l (95-155 µmol/l); Folgestudie: Harnstoff Median 9,1 mmol/l (6,5-15,1 mmol/l), Kreatinin 129,5 µmol/l (82-250 µmol/l). Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Höhe der Azotämie zwischen den azotämischen Hunden der Vorstudie und der Folgestudie. Die vergleichende Betrachtung aller Hunde (den azotämischen sowie den nicht-azotämischen) aus beiden Studien ergab, dass die Hunde der Folgestudie ein signifikant tieferes Kreatinin und ein signifikant höheres Albumin aufwiesen als dieselben Hunde der Vorstudie (Vorstudie Kreatinin Median: 96 µmol/l (Bereich 66-155 µmol/l), Albumin Median: 30 g/l (21-35 g/l); Folgestudie Kreatinin Median 89 µmol/l (52-220 µmol/l), Albumin Median: 34 g/l (22-40 g/l)). Ausserdem lag ein signifikanter Unterschied zwischen den erneut untersuchten BSH und Kontrollhunde

im Hinblick auf den gemessenen Harnstoff im Blut vor: Kontrollhunde der Folgestudie wiesen einen signifikant tieferen Harnstoff auf, als die BSH (BSH Median: 6,6 mmol/l (3,6-15,1 mmol/l); Kontrollhunde Median: 4,5 mmol/l (1,7-6,7 mmol/l); Referenzbereich: 3,8-9,4 mmol/l). Die Werte wurden in Zusammenhang mit der Klinik als nicht relevant betrachtet.

3.3.5 Antikörper gegen *B. burgdorferi*

3.3.5.1 Ergebnis der Borreliose-Serologie

Die Resultate der Borreliose-Serologie sind in Tabelle 14 dargestellt. Eine Unterteilung des Borreliose-Serologie in BSH und Kontrollhunde findet sich in Tabelle 15.

Auffallend ist, dass die Anzahl Antikörper-positiver und -negativer Hunde sich nicht signifikant geändert hat. In der ersten Studie waren 47 Hunde (57%) Borreliose-negativ und 36 Hunde (43%) Borreliose-positiv, in der Folgeuntersuchung waren 46 Hunde (55%) positiv und 37 Hunde (45%) negativ. Hunde aus der Vorstudie waren nicht statistisch häufiger positiv oder negativ als Hunde aus der Folgestudie. Bei 67% aller Hunde änderte sich der serologische Status nicht. Beinahe gleich viele Hunde serokonvertierten (17%) bzw. serorevertierten (16%). 34/53 (63%) BSH und 22/30 (73%) Kontrollhunde blieben Antikörper positiv oder negativ. 8/53 (15%) BSH und 6/30 (20%) Kontrollhunde serokonvertierten. 11/53 (21%) BSH und 2/30 (7%) Kontrollhunde serorevertierten.

3.3.5.2 Vergleich des Borreliose-Serologie mit dem Ergebnis des C₆-ELISA (SNAP-Test)

Bei diesem Vergleich wurde nicht zwischen Hunden aus der vorhergehenden Studie und solchen aus der Folgestudie unterschieden.

In Tabelle 16 ist der Vergleich der Ergebnisse des C₆-ELISA (SNAP-Test) mit unserem Goldstandard (siehe 2.2.2.3) dargestellt. 71 (78%) waren richtig negativ (Spezifität), 57 (80%) waren richtig positiv (Sensitivität).

Bei alleiniger Betrachtung der BSH ist die Sensitivität bei 96%, die Spezifität des Tests bei 68%, bzw. bei alleiniger Betrachtung der Kontrollhunde liegt die Sensitivität bei 37%, die Spezifität bei 92% (siehe Tabelle 17 und Tabelle 18). Unter den 12 falsch negativen Kontrollhunden waren je 6 Hunde aus der vorhergehenden Studie und 6 aus der Folgestudie. Interessanterweise waren 5 Hunde der vorhergehenden Studie ebenfalls in der Folgestudie in dieser Gruppe vertreten.

Alle 162 untersuchten Hunde waren negativ bezüglich *Ehrlichia canis* und *Dirofilaria immitis*.

3.3.6 Urinuntersuchung

3.3.6.1 Spezifisches Gewicht

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 als Boxplot zusammengefasst. In der Folgestudie hatten Kontrollhunde signifikant häufiger ein SG < 1.030 als BSH. Ein spezifisches

Gewicht < 1.030 hatten 19/51 BSH (37%) und 20/29 Kontrollhunde (69%). Ein spezifisches Gewicht > 1.030 hatten 32/51 BSH (63%) und 9/29 Kontrollhunde (31%). Das spezifische Gewicht des Harns der BSH der Folgestudie betrug im Median 1.033 (Bereich: 1.006-1.050), dasjenige der Kontrollhunde der Folgestudie 1.025 (1.006-1.046). Das Alter der Hunde schien keinen Einfluss auf das Spezifische Gewicht zu haben. In der vorhergegangenen Studie war das mediane Spezifische Gewicht bei den BSH 1.029, das der Kontrollhunde 1.026. Kontrollhunde hatten nicht signifikant häufiger ein SG < 1.030 .

Von 1 BSH aus der vorhergegangenen Studie und von 2 BSH und 1 Kontrollhund aus der Folgestudie lag kein spezifisches Gewicht vor.

3.3.6.2 Proteinurie

3.3.6.2.1 Urin-Protein-Kreatinin Quotient (UPC)

Alle Hunde dieser und der Vorstudie mit einem UPC > 0.3 sind in Tabelle 19 aufgeführt. Bei 3 Hunden (2 BSH und 1 Kontrollhund) aus der aktuellen Studie konnte kein UPC gemessen werden, da kein Urin vorhanden war. Ein BSH (73_K) hatte ein aktives Harnsediment (mehr als 4 Leukozyten pro Gesichtsfeld im Urin bei 400-facher Vergrößerung und Bakterien (*E. coli*) im Urin). 9 von 80 Hunden (11%), 6 BSH und 3 Kontrollhunde, hatten in der Folgestudie ein UPC > 0.3 (Wertebereich: 0.32-5.61, Median 0.44), wobei je ein BSH und ein Kontrollhund aus der ersten Studie ebenfalls wieder in der Folgestudie ein erhöhtes UPC aufwiesen.

Bei einem BSH aus der vorhergehenden Studie konnte kein UPC gemessen werden, da kein Urin vorhanden war. Ein BSH aus der vorhergegangenen Studie (137_S) hatte ein aktives Harnsediment (mehr als 4 Leukozyten pro Gesichtsfeld im Urin bei 400-facher Vergrößerung und Bakterien (*E. coli*) im Urin). In der vorhergegangenen Studie hatten 4 von 52 Hunden (8%), 3 BSH und 1 Kontrollhund, ein UPC > 0.3 (Wertebereich: 0.32-0.72, Median 0.45).

Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich des UPC zwischen den Hunden der vorhergehenden Studie und denen der Folgestudie (Median Folgestudie: 0.10, Bereich: 0.05-5.61; Median vorhergehende Studie: 0.11, Bereich: 0.06-0.72) obwohl 3 Werte (2 BSH und 1 Kontrollhund) über dem höchsten Wert der vorhergehenden Studie lagen.

Es hatten nicht signifikant mehr Hunde in der Folgestudie als in der vorhergegangenen Studie ein UPC > 0.3 . Zudem bestand kein signifikanter Unterschied in der Höhe des UPC, weder zwischen den BSH und Kontrollhunden der vorhergegangenen Studie oder der Folgestudie, noch zwischen den beiden Studien.

3.3.6.2.2 UPC und Borreliose

Es lässt sich kein Zusammenhang zwischen Borreliose-Serologie und einem erhöhten UPC erkennen. Von den 13 Hunden mit einem UPC > 0.3 (siehe Tabelle 19), waren 6 Hunde in der Borrelien-Serologie negativ, 7 Hunde waren positiv.

3.3.6.2.3 Mikroalbuminurie

In der Folgestudie waren 14 der 50 (28%) auf Mikroalbumin untersuchten BSH und 5 der 29 (17%) Kontrollhunde positiv im Mikroalbuminurie-Test, dieser Unterschied war nicht signifikant.

Aus der vorhergegangenen Studie wiesen 14 der 50 untersuchten BSH (28%) und 3 von 29 untersuchten Kontrollhunde (10%) Mikroalbuminurie auf, auch dieser Unterschied war nicht signifikant.

9 von 17 Hunden (52%) aus der ersten Studie waren auch in der zweiten Studie Mikroalbumin-positiv. Eine Übersicht über diese Hunde ist in Tabelle 20 zu sehen. Bei einer semiquantitativen Auswertung des Tests in leichtgradig, mittelgradig, stark und sehr stark positiv ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Hunden der Erst- und Folgeuntersuchung, ein Trend zu einer stärkeren Proteinurie der Hunde in der Folgestudie war vorhanden (siehe Tabelle 21). Ein signifikanter Unterschied bestand beim Vergleich der Mikroalbumin-Ergebnisse der „BSH aus beiden Studien“ und „Kontrollhunde aus beiden Studien“. 27% (28/102) aller BSH waren im Mikroalbumin-Test positiv, während nur 14% (8/58) aller Kontrollhunde positiv waren. Die im Mikroalbumin-Test positiven Hunde aus beiden Studien waren zu 55% Borreliose-positiv (20/36). Unter den 20 Mikroalbumin- und Borreliose-positiven Hunden aus beiden Studien waren 19 BSH (95%) und 1 Kontrollhund (5%), somit waren BSH signifikant häufiger vertreten.

3.3.6.3 SDS-AGE der Harnproteine

Von 80 Hunden (96%) der Folgeuntersuchung konnte eine Proteinelektrophorese durchgeführt werden. Fünfzehn (19%; 12 BSH und 3 Kontrollhunde), wiesen dabei ein unphysiologisches Proteinmuster auf.

5 (7%) von 67 mittels Elektrophorese untersuchten Hunde (2 BSH und 3 Kontrollhunde) aus der vorhergegangenen Studie wiesen ein unphysiologisches Proteinmuster auf, darunter war ein BSH mit einem positiven Hemmstoff-Test in der Harnkultur, welcher dann in der Folgestudie eine positive Harnkultur (*E.coli*) aufwies. Eine Zusammenfassung aller Hunde mit unphysiologischem Proteinmuster ist in Tabelle 22 dargestellt.

Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit von unphysiologischen Proteinmustern zwischen BSH und Kontrollhunden innerhalb der Studien, insgesamt gab es jedoch in der Folgestudie signifikant mehr Hunde mit unphysiologischen Proteinmustern als in der vorhergegangenen Studie.

Alle Hunde mit einem unphysiologischen Proteinmuster, bis auf 2 BSH der Folgestudie, wiesen einen positiven Mikroalbuminurie-Test auf.

Eine Bande bei ca. 30 kDa (vermutlich Argininesterase (Hubalek und Halouzka 1997; Teinfalt et al. 2000)) konnte bei 34 Hunden abgelesen werden. Darunter waren 32 intakte Rüden und 2 intakte Hündinnen. Die intakten Hündinnen wiesen jedoch beide ein gemischt glomeruläres und tubuläres Proteinmuster auf (siehe Abbildung 8). Trat die Bande bei intakten Rüden auf, wurde sie als physiologisch angesehen.

3.4 Zusammenfassung der Resultate

BSH starben nicht vermehrt an Glomerulonephritis. Die verstorbenen Hunde wiesen signifikant häufiger ein UPC > 0.3 auf als die besuchten Hunde.

Anamnestisch wurde bei den erneut untersuchten BSH nur bei 45% ein Zeckenschutz angewandt, wohingegen bei allen Kontrollhunden Zeckenprophylaxe betrieben wurde. Die hämatologischen und blutchemischen Resultate ergaben zwar kleinere, teilweise auch signifikante Unterschiede, welche jedoch im Zusammenhang mit der Klinik als nicht relevant betrachtet wurden. Die Borreliose-Serologie ergab, dass 67% der erneut untersuchten Hunde ihren serologischen Status nicht änderten, 17% serokonvertierten und 16% serorevertierten. Für den nun neu angewandten C₆-ELISA (SNAP-Test) konnte eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 78% ermittelt werden, wobei die Kombination aus ELISA und Western Blot als Goldstandard diene. In der Untersuchung des Urins fiel auf, dass BSH signifikant häufiger ein spezifisches Gewicht > 1.030 hatten. Die vergleichende Betrachtung des UPC zwischen den Hunden beider Studien lieferte keinen signifikanten Unterschied, es konnte auch kein Zusammenhang zwischen dem UPC und dem Ergebnis der Borreliose-Serologie hergestellt werden. Die Hunde der vorliegenden Studie hatten einen Trend zu einer stärkeren Mikroalbuminurie; „BSH aus beiden Studien“ wiesen signifikant häufiger eine Mikroalbuminurie auf, als „Kontrollhunde aus beiden Studien“. Unter den im Mikroalbumin-Test positiven Hunden, welche ebenfalls eine positive Borreliose-Serologie aufweisen, waren signifikant mehr BSH als Kontrollhunde. Die Auftrennung der Urinproteine ergab, dass Hunde der Folgestudie signifikant häufiger ein unphysiologisches Proteinmuster aufwiesen, als Hunde der Vorstudie.

4 Diskussion

4.1 Verstorbene Hunde

Bekanntlich ist die Lebenserwartung eines BSH, selbst für einen Hund dieser Grösse und Gewichtsklasse, nicht hoch (Eichelberg und Seine 1996; Michell 1999; Egenvall et al. 2000; Proschowsky et al. 2003; Bonnett et al. 2005; Egenvall et al. 2005). Dies spiegelt auch das Todesalter der Hunde in der vorliegenden Studie wieder: Das mediane Todesalter der BSH betrug 6, das der Kontrollhunde (hauptsächlich Landseer) 8 Jahre. In einer Studie aus Dänemark starben BSH im Medianen im Alter von 7 Jahren (Proschowsky et al. 2003). In einer anderen Studie wurden ca. 50% der untersuchten BSH zwischen 8 und 10 Jahre alt, 35% der Neufundländer, die in der hier durchgeführten Studie einen Teil der Kontrollhunde ausmachten, wurden 8-10 Jahre alt (Egenvall et al. 2005). Eine weitere Studie stellte BSH als die kurzlebigste Rasse, von 12 untersuchten Rassen, dar: BSH wiesen eine durchschnittliche Lebenserwartung von 6.8 Jahren auf, die gesamte Stichprobe aller Rassen hatte eine Lebenserwartung von 10 Jahren (Eichelberg und Seine 1996).

Die Todesursache bei den Hunden in der vorliegenden Studie nach Besitzerangabe war zu 37.5% eine Neoplasie. Dies deckt sich mit den Angaben aus der Literatur: Tumore waren in allen Studien die häufigste Todesursache. Je nach Studie starben 34% aller BSH (Proschowsky et al. 2003), bzw. 27.3% aller Hunde (Eichelberg und Seine 1996) an Tumoren. Eine Studie berichtete über ein gehäuftes Auftreten von Tumoren bei älteren, männlichen BSH, zudem erkrankten BSH auffallend früh, bereits ab 4 Jahren, an Tumoren (Egenvall et al. 2005).

Als recht unbefriedigend stellte sich die Art der Diagnoseerhebung heraus. Leider lag in der vorliegenden Studie nur von 8 der 40 verstorbenen Hunde ein pathologisches oder zytologisches Resultat vor, aus dem der genaue Grund der Euthanasie hervorging. Auch bei den oben genannten Studien über die Lebenserwartung von

Hunden wurde die Todesursache über Fragebögen ermittelt, die entweder vom behandelnden Tierarzt oder von den Besitzern selber beantwortet wurden. Die einzige Studie, in der die Todesursache von Hunden mittels Sektion bestätigt wurde, stammt aus dem Jahr 1982 (Bronson 1982). Leider waren darin keine BSH vertreten. Doch schon da starben 23% von 2002 untersuchten Hunde an den Folgen von Neoplasien.

Es wäre sicherlich zu wünschen, dass gerade bei Hunden, die in der Zucht eingesetzt werden, nicht nur im Hinblick auf Nierenerkrankungen, sondern im Hinblick auf jede möglicherweise vererbte Erkrankung, die Todesursache festgestellt und in einem zentralen Register vermerkt würde. Dies ist laut dem Zucht- und Körreglement des Klubs für Berner Sennenhunde zwar vorgeschrieben, wurde in den letzten Jahren jedoch vernachlässigt. Die Zuchtkommission des Klubs für Berner Sennenhunde plant verstärkte Nachforschungen der Todesursachen ihrer Zuchthunde, und sieht auch Sanktionen bei unterlassener Meldung vor (Syfrig 2006).

4.2 Erneut besuchte Hunde

4.2.1 Untersuchungsabstand

Die BSH und Kontrollhunde wurden nach ca. 3 Jahren erneut untersucht. Der zeitliche Abstand zwischen beiden Untersuchungen war bei BSH grösser als bei den Kontrollhunden. Der Unterschied kam dadurch zustande, dass in beiden Studien jeweils zu Beginn BSH untersucht worden waren und gegen Ende vermehrt Kontrollhunde; da sich jedoch die vorhergegangene Studie über einen längeren Zeitraum hinzog (die Besitzer mussten erst zur Teilnahme motiviert werden, es waren mehr Hunde) als die Folgestudie, war somit der zeitliche Abstand zwischen Beginn der Vorstudie und Beginn der Folgestudie grösser als der zeitliche Abstand zwischen Ende der Vorstudie und Ende der Folgestudie. Da der Unterschied jedoch nur 52 Tage betrug scheint er vernachlässigbar.

4.2.2 Fragebogen

Der Fragebogen, den die Besitzer gebeten wurden auszufüllen, ergab einige Unterschiede zwischen dem Allgemeinzustand der Hunde aus der Vorstudie und demjenigen der Hunde der Folgestudie. Es ist davon auszugehen, dass nach einem Zeitabstand von beinahe 3 Jahren die Hunde gewisse Alterungsanzeichen aufwiesen. So ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass häufiger, sowohl bei den BSH als auch bei den Kontrollhunden, bei der Frage nach dem Allgemeinzustand und der Kondition diese als reduziert angegeben wurden, häufig mit der Begründung, dass der Hund eben alt sei. Ebenso wiesen die Hunde nun häufiger Lahmheiten auf, wobei kein Zusammenhang mit *B. burgdorferi* Antikörpertitern hergestellt werden konnte. Die Frage nach dem Auslandsaufenthalt wurde neu in den Fragebogen aufgenommen, somit sind keine Angaben aus der vorhergehenden Studie vorhanden. Ziel dieser Frage war, die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit Erregern minimieren zu können, die ebenfalls in der Lage sind, Glomerulonephritis zu verursachen, jedoch vor allem im südlichen Europa vorkommen, wie z.B. Leishmaniose, Dirofilariose oder Babesiose (Vaden 2005). Durch die zusätzliche Untersuchung der Hunde mit Hilfe des SNAP[®]_{3Dx}[™]-Test parallel zu *B. burgdorferi*

auf Antigen von *Dirofilaria immitis* und Antikörper gegen *Ehrlichia canis* wurden diese Krankheiten ausgeschlossen.

4.2.3 Borreliose

In dieser Studie galt ein Hund als seropositiv gegenüber Borrelien, wenn der ELISA und der Western Blot positiv ausfielen. Durch die Kombination zweier positiver Testergebnisse sollte die Sensitivität optimiert werden. Serologische Screening-Verfahren wie der ELISA und der indirekte IFT (Immunfluoreszenstest), verwenden ganze Zellen, welche viele Proteine aufweisen, die auch andere Bakterien (z.B. Leptospiren) besitzen und somit Kreuzreaktionen hervorrufen können (Burgess et al. 1989; Frank 1989; Lindenmayer et al. 1990; May et al. 1990; Shin et al. 1993). Aus diesem Grund wurden die Seren, welche im ELISA getestet wurden vorher mit einem Bakteriengemisch präadsorbiert (siehe 2.2.2.3.1). Falsch-negative Ergebnisse sind selten (Greene und Straubinger 2006), weswegen wir in unserer Studie alle im ELISA negativen Hunde als serologisch negativ beurteilten, unabhängig ihres Ergebnisses aus dem Western Blot. Serologische Untersuchungen im Frühstadium können aber negativ sein. Experimentell infizierte Hunde waren erst nach 4 bis 6 Wochen nach Infektion im IgG-ELISA positiv (Appel et al. 1993). Die höchsten IgG-Titer wurden nach 3 Monaten gemessen, und blieben über 2 Jahre erhöht (Straubinger et al. 2000). Beim Mensch konnte noch 10 bis 20 Jahre nach gestellter Diagnose eine Antikörper-Reaktion gefunden werden (Kalish et al. 2001). Deshalb kann es sein, dass Hunde, die sich in der vorhergegangenen Studie frisch mit Borrelien infiziert hatten, in der Folgestudie immer noch hohe Antikörpertiter hatten und als Borreliose-positiv galten, auch wenn sie sich in der Zwischenzeit nicht erneut mit Borrelien infiziert hatten. Es gibt Berichte, denen zufolge hohe Serumtiter nach einer Antibiotikatherapie abfallen oder ganz verschwinden. Erneute Anstiege 6 Monate nach Therapieende wurden als erneutes Wachstum überlebender Spirochäten gedeutet (Jacobson et al. 1996; Hilton et al. 1997). Information über eine mögliche Behandlung mit Antibiotika wurden nicht erhoben, da solche Angaben kaum zuverlässig gewesen wären. Aus diesem Grund kann auch keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Titer bei den einzelnen Hunden auf Grund einer antibiotischen Therapie abfielen.

4.2.3.1 Folgeuntersuchungen Borreliose

Interessanterweise änderten die Hunde der vorliegenden Studie zu 69% ihren serologischen Status nicht, 17% serokonvertierten und 14% serorevertierten. Die meisten Studien die sich mit Folgeuntersuchungen bei mit Borrelien infizierten Patienten befassten wurden beim Mensch durchgeführt. Es liegen nur wenige Berichte über den Hund vor. Der Vergleich der humanmedizinischen Studien mit denen des Hundes ist schwierig, weil Hunde normalerweise häufiger mit Zecken in Kontakt kommen als Menschen, und somit ein höheres Risiko haben sich mit Borrelien zu infizieren oder zu reinfizieren.

Dies wird deutlich, wenn man eine Studie beim Menschen (Fahrer et al. 1998) mit der vorliegenden bzw. den weiter unten aufgeführten serologischen Verlaufsuntersuchungen aus der Tiermedizin vergleicht. In einer längerfristigen Übersicht über 7 Jahre (Fahrer et al. 1998) wurde ein Teil der in einer ersten Studie vorgestellten (Fahrer et al. 1988a), positiv getesteten schweizerischen

Orientierungsläufer erneut serologisch untersucht. Bei 58% konnte eine Seroreversion festgestellt werden, was eine recht hohe Anzahl an Personen darstellt, welche in der Folgeuntersuchung serologisch negativ waren. In der vorliegenden Studie serorevertierten gerade einmal 14% der Hunde, was vermutlich mit dem häufigeren Zeckenkontakt und der daraus folgenden höheren Wahrscheinlichkeit einer Reinfektion zusammenhängt. Es wurden keine der in der ersten Phase negativ getesteten Personen erneut untersucht. In einem anderen Artikel desselben Autors wurde die Entwicklung der Seroprävalenz bei damals negativ getesteten Teilnehmern nach sechs Monaten beschrieben (Fahrer et al. 1991). Dabei wurde festgestellt, dass von den ursprünglich 558 negativ getesteten Personen in der Zwischenzeit 45 (8%) serokonvertiert waren. Dies ist im Vergleich mit den Hunden aus der hier vorliegenden Studie (14/83; 17%) eine geringere Zahl, jedoch darf man nicht ausser Acht lassen, dass die erneute serologische Kontrolle der ursprünglich negativ getesteten Orientierungsläufer bereits nach sechs Monaten erfolgte und in der vorliegenden Studie beinahe 3 Jahre vergingen, während denen sich die Hunde erneut infizieren konnten. Die Hunde der vorliegenden Studie hatten somit länger Zeit und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit, sich erneut zu infizieren.

Die serologische Antikörperentwicklung in der vorliegenden Studie bei den BSH und bei den Kontrollhunden war ungefähr dieselbe. Auffallend war, dass ca. 2/3 sowohl der BSH als auch der Kontrollhunde ihren serologischen Status nicht änderten. In einer anderen Studie wurden 202 Hunde, aus Connecticut, einem Gebiet, in dem Lyme-Borreliose endemisch vorkommt in den USA, nach 20 Monaten erneut serologisch untersucht (Levy und Magnarelli 1992). 52% der erneut untersuchten Hunde waren bei der ersten Untersuchung serologisch positiv gegenüber Borrelien, 48% waren serologisch negativ. Unter den in der ersten Studie positiv getesteten Hunden waren in der Folgeuntersuchung 76% (vorliegende Studie: 64%) immer noch positiv, 24% (vorliegende Studie: 36%) serorevertierten. 91% (vorliegende Studie: 57%) der vorherigen negativ getesteten Tiere blieben negativ, 9% (vorliegende Studie: 30%) serokonvertierten. Sowohl in der oben genannten Studie als auch in der vorliegenden Studie war der Hauptteil der untersuchten Hunde serologisch stabil; es fand weder eine Serokonversion noch eine Seroreversion statt. In beiden Studien war ungefähr die Hälfte der Hunde seropositiv bzw. seronegativ, bei der Erstuntersuchung wie auch bei der Folgeuntersuchung. In einer weiteren Studie wurden 175 Hunde serologisch verfolgt, wobei kein einheitlicher Untersuchungsabstand zwischen Erst- und Folgeuntersuchung eingehalten wurde (Magnarelli et al. 1990). 92% der beschriebenen Hunde blieben seropositiv, es wurde kein Hund beschrieben, der serorevertierte. 5% der Hunde blieben seronegativ und 3% serokonvertierten. Diese Ergebnisse weichen insofern von denen der vorliegenden Studie ab, als dass keine serorevertierten Hunde beschrieben wurden, ausserdem weicht die serologische Verteilung der Hunde extrem von der von uns und von Levy et al (1992) beobachteten ab. Ein Faktor der die Differenz erklären könnte wäre das Untersuchungsintervall, welches nicht einheitlich war, d.h. es wurden Hunde bereits nach 1 bis 2 Monaten erneut untersucht, andere erst nach 4 Jahren. Es scheint unwahrscheinlich, dass sich Borreliose-negative Hunde innerhalb eines Monats infizieren, bzw. dass bei Borreliose-positiven Hunden der Antikörpertiter soweit abfällt, dass er negativ wird. Dies könnte evtl. den geringeren Anteil der Hunde erklären, die ihren serologischen Status änderten. In der einzigen Langzeitstudie aus Europa wurden 33 Hunde serologisch über 3 Jahre verfolgt (Hovius et al. 1999). Zwei Mal pro Jahr wurde eine serologische Untersuchung durchgeführt, einmal in der von ihnen bezeichneten „Risiko-Zeit“ (Mai bis November)

und einmal in der „nicht-Risiko-Zeit“ (Dezember bis April), wobei in der Studie nicht der Verlauf der einzelnen serologischen Gruppen angegeben wurde, sondern der Verlauf aller Hunde. Dabei wurde festgestellt, dass die Anzahl der erlebten „Risiko-Zeiten“ der Hunde einen Einfluss auf den Antikörperspiegel hat, sowie der Zeitpunkt der Blutentnahme („Risiko-Zeit“ oder „nicht-Risiko-Zeit“) den Antikörperspiegel signifikant beeinflusste. Hundeserum, welches während der „Risiko-Zeit“ gesammelt wurde wies höhere OD-Werte auf, als Hundeserum, welches während der „nicht-Risiko-Zeit“ gesammelt wurde. Demnach müssten in der vorliegenden Folgestudie mehr antikörperpositive Hunde sein, da alle Hunde in der als „Risiko-Zeit“ bezeichneten Periode untersucht wurden. Dies ist jedoch nicht der Fall. Eine Aussage über Änderung des Antikörperspiegels während des Besuchs in der „Risiko-Zeit“ oder „nicht-Risiko-Zeit“ konnten wir mit unserer Studie nicht machen, da in der Folgestudie alle Hunde zwischen Juni und Oktober besucht wurden, also in der von Hovius als „Risiko-Zeit“ bezeichneten Zeitspanne. Die Kontrollhunde wurden in der Erstuntersuchung alle in der „nicht-Risiko-Zeit“ untersucht. Hier könnte man eine Gemeinsamkeit mit der oben genannten Studie sehen, da 22 der 30 Kontrollhunde antikörpernegativ waren, während in der Folgestudie, in der alle Hunde in der „Risiko-Zeit“ untersucht wurden nur 18 Kontrollhunde seronegativ waren. Dies würde die Aussage unterstützen, dass Hunde in der „Risiko-Zeit“ höhere OD-Werte haben, und somit eher als positiv gewertet werden, als Hunde in der „nicht-Risiko-Zeit“. Bei der kleinen Anzahl an Hunden (n=30 bei den Kontrollhunden) ist die Aussagekraft jedoch sehr begrenzt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Studien aus der Humanmedizin nur schwer mit denen aus der Tiermedizin vergleichbar sind, da Hunde eine höhere Zeckenexpositionswahrscheinlichkeit haben, und somit auch ein höheres Risiko, sich mit Borrelien zu infizieren. Die Ergebnisse Studien aus der Tiermedizin stimmen teilweise mit der vorliegenden Studie überein, jedoch stammen die meisten Studien aus den USA. Die einzige aus Europa stammende Studie kann nur schwer mit der hier durchgeführten verglichen werden, da sich die Ergebnisse auf sogenannte „Risiko-Zeiten“ und „nicht-Risiko-Zeiten“ beziehen, und dies bei der Planung der Probennahme der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt wurde.

4.2.3.2 C₆-ELISA

Durch die Hinzunahme des C₆-ELISAs lag uns ein weiterer Test vor, der vor allem in den aktuellen tiermedizinischen Standardlehrbüchern häufig erwähnt wird (Vaden 2005; Greene und Straubinger 2006).

Sowohl humane als auch veterinärmedizinische C₆-ELISAs sind auf dem Markt. Variationen im Gen, welches für das VlsE (variable major protein-like sequence, expressed), ein Oberflächen-Antigen, kodiert, ermöglichen es den Spirochäten, sich der Immunantwort zu entziehen. Eine immunodominante Region (IR₆) des VlsE, welches ursprünglich aus einer europäischen Spezies von *B. garinii* isoliert wurde, ist bei *B. garinii*, *B. afzelii* und verschiedenen anderen *B. burgdorferi*-Stämmen und Genospezies genetisch, strukturell und antigenetisch konserviert. Die Gene der IR₆ werden nur während der Replikation im Säugetierwirt exprimiert; das Protein wurde weder in Zecken gefunden, die noch keine Blutmahlzeit aufgenommen hatten, noch bei solchen, die unter Umgebungstemperaturen, wie sie für Vakzinen oder diagnostische Antigene benötigt werden, gehalten wurden. Das rekombinant produzierte Peptid C₆, welches als Antigen bei den von uns verwendeten SNAP-Tests eingesetzt wird, entspricht der IR₆-Sequenz und besteht aus 26 Aminosäuren.

Die Antikörper-Antwort des Immunsystems des Wirts auf dieses C₆-Protein wird nun in der Serodiagnostik der Human- und Tiermedizin als ein Marker für eine aktive Infektion geführt und deutet auf das Vorhandensein von Borrelien hin. Dieses Verfahren löst sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin immer mehr das konventionelle Zwei-Schritt-Verfahren des Ganzzell-ELISA in Kombination mit dem Immunoblot ab (Marques et al. 2002; Bacon et al. 2003). Seit einiger Zeit ist ein kommerzieller C₆-ELISA erhältlich. In Studien, in denen Hunde, die künstlich (Liang et al. 2000; Philipp et al. 2001) oder auf natürlichem Weg (Levy et al. 2002) mit Borrelien infiziert wurden, stieg respektive sanken nach Behandlung die Anti-C₆-Antikörper-Titer schneller als die Antikörper-Titer gemessen mit einem Ganzzell-ELISA (Philipp et al. 2001). Ein weiterer Vorteil des C₆-ELISA ist darin zu sehen, dass weder Kreuzreaktionen mit anderen Infektionserregern, wie *Dirofilarien*, *Babesien*, *Ehrlichien* oder *Leptospiren*, noch mit *OspA*-, Ganzzell-, oder sonstigen Vakzinen gegen andere Erkrankungen bekannt sind (Liang et al. 2000; O'Connor et al. 2004). Da nicht alle mit virulenten Borrelien infizierten Hunde Krankheitssymptome entwickeln, und *B. burgdorferi sensu lato* und andere nahe verwandten Stämme und Genospezies in ihrer Pathogenität variieren, korreliert die C₆-Antikörper Antwort nicht immer mit der klinischen Erscheinung der Hunde (Greene und Straubinger 2006). Gerade der Nachweis nicht-pathogener Spezies mittels C₆-ELISA könnte eine Erklärung für die 20 Hunde aus der vorliegenden Studie sein, welche im C₆-ELISA positiv reagierten, in unserem Goldstandard (ELISA + Westernblot) jedoch als negativ eingestuft wurden. Für die 14 Hunde aus unserer Studie, die wir als im C₆-ELISA falsch negativ reagierend eingestuft hatten, könnten Kreuzreaktionen mit anderen Bakterienspezies in den von uns als Goldstandard verwendeten Tests (ELISA und Western Blot) verantwortlich sein. Eine Begründung für das gehäufte Vorkommen von falsch positiven Ergebnissen im C₆-ELISA der BSH und falsch negativen Ergebnissen im C₆-ELISA der Kontrollhunden konnte nicht gefunden werden. Auffallend war, dass von den 12 falsch negativen Kontrollhunden 5 Hunde in beiden Studien falsch negativ waren. Es konnte jedoch keine Gemeinsamkeit bei diesen 5 Hunden festgestellt werden, die sie von Hunden der anderen Kategorien unterschied. Andererseits korrelierte bei den BSH das Ergebnis des C₆-ELISA gut mit unserem Goldstandard.

In naher Zukunft wird auch in Europa ein Test verfügbar sein, der C₆-Antikörpertiter quantitativ bestimmt (Lyme Quant C₆ test, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA). Damit können Verläufe besser untersucht werden.

4.2.4 Glomerulonephritis

Entgegen unseren Erwartungen wiesen die meisten der in der vorliegenden Studie untersuchten Hunde keine Anzeichen einer Nierenerkrankung auf. Es ist schwer eine Aussage bezüglich einer möglichen Nierenveränderung in einer Population von Hunden zu machen, die nach Aussagen der Besitzer keine Anzeichen einer Nierenerkrankung aufweisen. Neben der Anamnese (siehe 4.2.2) wollten wir anhand von Blut- und Urinuntersuchungen Hinweise auf eine sich langsam entwickelnde Glomerulonephritis erhalten. Wichtige Parameter im Blut waren Harnstoff und Kreatinin, sowie Protein, Albumin und Cholesterin. Bei der Urinuntersuchung interessierte uns vor allem das spezifische Gewicht, das UPC, das Resultat des Mikroalbuminurie-Tests und, falls vermehrt Protein ausgeschieden wurde, die Art des ausgeschiedenen Proteins, welche mittels SDS-AGE genauer bestimmt wurde. Eine

Nierenbiopsie war nicht möglich, da die Proben bei den Besitzern daheim entnommen wurden, und wäre auch nicht gerechtfertigt gewesen, da keine Indikation bestand.

4.2.4.1 Hämatologie und spezifisches Gewicht

Das spezifische Gewicht der in beiden Studien untersuchten Hunde, welche von ihren Besitzern als gesund betrachtet wurden, stellte sich als sehr variabel heraus (1.006 bis 1.050). Sowohl der Mittelwert unserer beiden Studien (1.029 ± 0.012) als auch der Bereich der Werte stimmen recht gut mit einer anderen Studie überein, bei welcher bei gesunden Hunden das spezifische Gewicht untersucht wurde (Mittelwert 1.031 ± 0.012 ; Wertebereich 1.006 bis > 1.050) (van Vonderen et al. 1997). Was bei uns auffiel war, dass das spezifische Gewicht der Kontrollhunde häufiger unter 1.030 lag als dasjenige der BSH. Das tiefere spezifische Gewicht korrelierte auch mit einem ebenfalls tieferen Harnstoffgehalt im Serum, was auf vermehrte Diurese hinweisen könnte. Da das Trinkverhalten der Hunde nicht erfasst wurde, kann vermehrtes Trinken als Ursache nicht ausgeschlossen werden. In der oben genannte Studie wurde festgestellt, dass mit zunehmendem Alter der Hunde das spezifische Gewicht des Harns abfiel, ausserdem war das spezifische Gewicht morgens höher als am Abend (van Vonderen et al. 1997). In unserer Studie schien das Alter keinen Einfluss auf das spezifische Gewicht zu haben, dies könnte daran liegen, dass die zwei ältesten Hunde nur 11 Jahre alt waren. Da wir nur eine einmalige Urinprobe nahmen, meistens am Vormittag oder frühen Nachmittag, kann keine Aussage über den Verlauf des spezifischen Gewichts während des Tages gemacht werden. Das Vorhandensein eines tiefen spezifischen Gewichts in einer ersten Probe schliesst das Vorhandensein eines hohen spezifischen Gewichts in einer zweiten Probe nicht aus (van Vonderen et al. 1997).

4.2.4.2 Mikroalbuminurie

Eine Mikroalbuminurie kann als erstes Anzeichen einer Nierenschädigung auftreten. Es ist jedoch auch bekannt, dass vorübergehende Einflüsse wie Fieber, Krämpfe, Stress, extreme Temperaturen, venöse Kongestion, starke körperliche Anstrengung, wie z.B. Schwimmen, zu kurzfristiger Mikroalbuminurie führen können (Joles et al. 1984). Die Vorteile des hier verwendeten Mikroalbuminurie-Tests sind die gute Spezifität und Genauigkeit aufgrund der Verwendung von Antikörpern, welche spezifisch gegen kanines Albumin gerichtet sind, das Festlegen eines einheitlichen spezifischen Gewichts von 1.010 vor Durchführung des Tests und das schnelle Vorliegen des Testergebnisses. Eine Einschränkung, die dieser ELISA mit sich bringt ist das semi-quantitative Ergebnis (Vaden 2003).

In mehreren Studien wurden gesunde, wie auch kranke Hunde auf Mikroalbuminurie getestet. Die Ergebnisse wichen etwas von einander ab. So wiesen in einer Studie 19% der von ihren Besitzern als klinisch gesund betrachteten Hunde einen positiven Mikroalbuminurie-Test auf, hingegen wiesen 36% aller Hunde, deren Besitzer wegen unterschiedlicher Fragestellungen ein Tierspital aufsuchten einen positiven Mikroalbuminurie-Test auf (Jensen et al. 2001). In einer grösseren Studie wiesen 24.7% aller untersuchten Hunde Mikroalbumin im Urin auf (Radecki et al. 2003; Vaden 2004). Die Beziehung zwischen Alter und der Anzahl positiv getesteter Hunde war signifikant. Das mittlere Alter der Hunde betrug 7.5 Jahre. Bei den zwischen 3

und 5 Jahre alten Hunden betrug der Anteil der Mikroalbumin-positiven Hunde 8.6%, bei den Hunden zwischen 6-8 Jahren 20%, somit waren mehr als doppelt so viele Hunde der älteren Population positiv im Mikroalbuminurie-Test. Das mittlere Alter der Hundepopulation, welche in der vorliegenden Studie, wie auch in der Vorstudie untersucht wurden lag in der ersten Studie bei 3.9 Jahren, in der Folgestudie bei 6.3 Jahren, der Prozentsatz der im Mikroalbuminurie-Test positiven Hunde stieg leicht von 21.3% auf 23.8%. Dabei fällt auf, dass in der vorliegenden Studie bzw. der Vorstudie bereits die Gruppe der jüngeren Hunde häufiger positive Mikroalbuminurie-Testergebnisse hatte, als die entsprechende Altersgruppe in der vorher genannten Studie. In der Gruppe der älteren Hunde hingegen sind die Zahlen ähnlich. In beiden Studien wurden die Hunde von ihren Haltern im Wesentlichen als „gesund“ betrachtet. Daher scheint mir der extreme Anstieg der Häufigkeit von positiven Mikroalbuminurie-Tests bei Hunden der Studie von Radecki et al. (2003), der bei unseren Hunden nicht zu verzeichnen war, bemerkenswert. Die Hunde unserer Studie zeigten von Anfang an häufiger Mikroalbumin im Urin. Es scheint sich jedoch in der Hälfte der Fälle um eine vorübergehende Mikroalbuminurie zu handeln, da nur ca. die Hälfte der in der vorhergehenden Studie Mikroalbuminurie-positiven Hunde ebenfalls in der Folgestudie wieder einen positiven Mikroalbuminurie-Test aufwies. Wie oben bereits erwähnt, stand uns nur eine Urinprobe pro Tier zur Verfügung. Wenn man die vielen unterschiedlichen oben genannten Einflüsse berücksichtigt, die die Ausscheidung von Albumin beeinflussen, kann es sein, dass ein Mikroalbuminurie-positiver Hund zu einem späteren Zeitpunkt negativ wird und umgekehrt. Unsere Ergebnisse unterstützen somit die Forderung nach mindestens 3 Mikroalbumin-positiven Urinproben als Nachweis einer persistierenden Proteinurie, wie auch im „Consensus Statement“ des ACVIM über Proteinurie gefordert wird (Lees et al. 2005). Drei Untersuchungen nacheinander wäre aber von den Besitzern der Tiere nicht toleriert worden, da gerade die Zystozentese als besonders invasiv beurteilt wurde. Für die Bestimmung des spezifischen Gewichts, des UPCs und des Mikroalbumin ist Spontanharn, der auch durch die Besitzer aufgesammelt werden könnte ausreichend, nur kann durch Spontanharn eine Zystitis, welche das spezifische Gewicht, das UPC sowie das Mikroalbumin beeinflussen kann nicht ausgeschlossen werden.

4.2.4.3 Proteinurie

Nach den „2004 ACVIM Consensus Statements“ über Proteinurie (Lees et al. 2005) wird von einer persistierenden renale Proteinurie dann gesprochen, wenn entweder bei einer einmaligen Urinprobe das $UPC \geq 0.5$ ist, oder, wenn bei jeweils 3 Urinproben, die mindestens im Abstand von 2 Wochen voneinander genommen wurden, eine Mikroalbuminurie vorlag, welche nicht im Zusammenhang mit einem prärenalem oder postrenalem Geschehen gebracht werden konnte. Da wir in unseren beiden Studien nur jeweils eine Urinprobe genommen hatten, können wir nur das UPC zu Hilfe nehmen, um bei unseren Hunden einen Hinweis auf eine persistierende renale Proteinurie zu erhalten. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine persistierende Proteinurie sowohl bei Menschen, als auch bei Hunden und Katzen mit einem erhöhten Sterblichkeitsrisiko einhergeht (Syme und Elliott 2003; Walker et al. 2004; Jacob et al. 2005). Dies konnten wir in unserer Studie nachvollziehen. 5 der 7 in der ersten Studie im Feld untersuchten Hunde mit einem $UPC \geq 0.5$ waren in der Zwischenzeit verstorben, zu einem Hund bestand in der Folgeuntersuchung kein Zugang mehr und 1 Hund, ein BSH, konnte erneut

besucht werden. Bei ihm war ein Anstieg des UPC von 0.72 bei der Erstuntersuchung auf 1.26 in der Folgeuntersuchung zu verzeichnen. Da jedoch in der vorhergehenden Studie ein UPC-Grenzwert von 0.3 ermittelt wurde, beziehen sich die im Resultate-Teil gemachten Angaben zum UPC nicht auf den Grenzwert von 0.5 des „2004 Consensus Statements“ zu Proteinurie

4.2.4.4 SDS-AGE

Mittels SDS-AGE kann eine qualitative Aussage über die im Urin vorhandenen Proteine gemacht werden. Nach Zini et al. (2004) beträgt die Sensitivität des Tests für glomeruläre Erkrankungen 100%, für tubuläre 92.6%; die Spezifität beträgt 40% bzw. 62.5%. Es können Proteine in einem Bereich zwischen 9kDa und 900kDa sichtbar gemacht werden. Jedoch kann mittels SDS-AGE alleine keine Aussage über die Art einer Glomerulopathie gemacht werden. Hierzu ist eine Nierenbiopsie nötig, die in unserer Studie nicht durchgeführt wurde (Zatelli et al. 2003). Bonfanti et al. (2004) unterschieden zwischen Banden im Bereich von 22-27kDa, die als freie leichte Ketten von Immunglobulinen interpretiert wurden und Banden im Bereich von 67-72kDa (Albumin). Beide Arten von Banden wurden bei Hunden ohne histologisch feststellbare Nierenschäden gefunden. In einer anderen Studien wurden 14 Hunde ohne Auffälligkeiten bei der lichtmikroskopischen und immunhistochemischen Untersuchung von Nierenbiopsien, sowie bei der Untersuchung des Urin-Sediments beschrieben (Zatelli und Bonfanti 2002). Alle untersuchten Hunde hatten entweder keine Banden oder nur eine schwache Bande im Bereich von Albumin, weshalb wir bei der Interpretation unserer Resultate eine schwache Bande im Bereich von Albumin als physiologisch betrachteten. In der vorliegenden Studie wiesen im Gegensatz zu der vorhergegangenen Studie, bei der bei den meisten Hunden mit einem UPC > 0.3 keine unphysiologischen Banden in der Elektrophorese festgestellt werden konnten, alle 9 Hunde mit einem UPC > 0.3 unphysiologische Banden in der Elektrophorese auf. Um die Nierenschädigung der Hunde mit einem UPC > 0.3 oder glomerulären, tubulären oder gemischten Banden genauer zu charakterisieren, wäre eine Nierenbiopsie sicher interessant gewesen.

Bei den Banden im Bereich von ca. 30kDa kann es sich entweder um Argininesterase handeln, was vor allem bei intakten Rüden ohne auffällige weitere Banden nahe liegt, oder um freie leichte Ketten von Immunglobulinen, die im Bereich von 22.5kDa bis 29kDa zu finden sind (Leifer und Matus 1986; Matus et al. 1986). Das Vorhandensein von Argininesterase im Zystozentese-Urin von intakten Rüden wurde durch Reflux von Harn aus dem Bereich der proximalen Urethra in die Harnblase erklärt (Teinfalt et al. 2000). Auch wir konnten eine Bande im Bereich von 30 kDa bei intakten Rüden sehen. Allerdings kann es bei intakten Rüden mit tubulärem Muster durch die enge nachbarschaftliche Lage der Banden der freien leichten Ketten auf dem Gel zu Interpretationsschwierigkeiten oder Verwechslungen kommen. Dies könnte auch bei den 2 Hündinnen der Fall gewesen sein, die unter anderem Banden im Bereich von 30 kDa aufwiesen. Beide hatten ein UPC > 1 und hatten somit einen Hinweis auf eine Nierenschädigung. Damit kann vermutet werden, dass es sich bei den festgestellten Banden um freie leichte Ketten, und nicht um Argininesterase handelte, zumal die Hündinnen in der Zeit vor der Urinentnahme nicht gedeckt worden waren.

Auffallend war, dass in der Folgestudie deutlich mehr Hunde unphysiologische Proteinbanden aufwiesen. Ebenfalls unterschied sich die Art der Banden der Hunde der Folgestudie von denen der vorhergegangenen Studie: Wiesen Hunde in der

vorhergegangenen Studie als unphysiologisches Resultat nur eine verstärkte Albuminbande auf, so waren jetzt neben Albumin auch Banden nur im glomerulären, bzw. tubulären Bereich oder gemischte Banden feststellbar. Eine mögliche Erklärung für die Variabilität der Banden in der Folgestudie könnte, neben dem Vorliegen eines Nierenschadens, auch das inzwischen fortgeschrittene Alter der Hunde sein, da mit zunehmendem Alter die Zahl der an Glomerulonephritis erkrankten Hunde steigt (Muller-Peddinghaus und Trautwein 1977).

4.2.5 Borreliose und Glomerulonephritis

In einer Studie wurden junge, asymptomatische Golden und Labrador Retriever auf das Vorhandensein von Mikroalbuminurie untersucht, parallel dazu wurden die Hunde serologisch mittels Western Blot und mittels C₆-ELISA auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* untersucht. Das Ziel war einen möglichen Zusammenhang zwischen *B. burgdorferi* Antikörpern und Mikroalbuminurie herstellen zu können, dies gelang aber nicht (Goldstein et al. 2005). Trotzdem wurde der Schluss gezogen, dass sich der Mikroalbuminurie-Test als Test zur Früherkennung der sogenannten Lyme-Nephritis eignet. Tatsächlich haben wir in unserer Studie einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Borreliose-positiven und Mikroalbuminurie-positiven Hunden festgestellt. Dieses Resultat sollte aber mit Vorsicht betrachtet werden, da sich die Einteilung eines Hundes in die „Mikroalbuminurie-positive-Gruppe“ als nicht sehr konstant herausstellte: gerade einmal 52% der Mikroalbuminurie-positiven Hunde waren auch in der Folgeuntersuchung Mikroalbuminurie-positiv. Auch bei den Hunden mit einem erhöhten UPC (UPC > 0.3) waren es jeweils nur ein BSH und ein Kontrollhund, die sowohl in der Vorstudie als auch in der Folgestudie vermehrt Protein mit dem Urin ausschieden. Insofern fehlt in der vorliegenden Studie die Gruppe der „Hunde mit Verdacht auf Glomerulonephritis“, bzw. ist recht klein. Hier eine Aussage hinsichtlich eines Zusammenhangs mit Borreliose zu machen halte wäre sehr gewagt.

5 Schlussfolgerungen

Die Mehrzahl der Hunde unserer Studie, sowohl der Berner Sennenhunde als auch der Kontrollhunde, wiesen keine Anzeichen einer Nierenveränderung auf. Somit konnte in der von uns untersuchten Population kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Antikörpern gegen Borrelien und Nierenschäden hergestellt werden. Es bleibt nach wie vor unklar, warum Berner Sennenhunde häufiger Glomerulonephritis aufweisen als Hunde anderer Rassen.

Die in der Vorstudie aufgestellte Hypothese, dass Nierenveränderungen bei den BSH akut auftreten, und deswegen nicht erfasst wurden, bleibt auch in der Folgestudie am wahrscheinlichsten, obwohl sie nicht bestätigt werden konnte.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht verfolgte Hunde	34
Tabelle 2: Übersicht Hunde ohne Zugang: Antikörperstatus/Urin-Protein-Kreatinin Verhältnis (UPC)	34
Tabelle 3: Übersicht verstorbene Hunde: Antikörperstatus/Urin-Protein-Kreatinin Verhältnis (UPC)	34
Tabelle 4: Rasse, Anzahl und % aller verstorbenen	35
Tabelle 5: Gesicherte Todesursachen	35
Tabelle 6: Todesursache nach Besitzeraussage	35
Tabelle 7: Borreliose-Serologie verstorbener Hunde	36
Tabelle 8: Übersicht besuchte Hunde: Antikörperstatus/Urin-Protein-Kreatinin Verhältnis (UPC)	36
Tabelle 9: Untersuchte Hunde	36
Tabelle 10: Anamnese der Hunde	36
Tabelle 11: Blutwerte Folgestudie	38
Tabelle 12: Blutwerte vorhergehende Studie	38
Tabelle 13: Azotämische Hunde aus beiden Studien	39
Tabelle 14: Borreliose-Antikörper Entwicklung	40
Tabelle 15: Borreliose-Antikörper Entwicklung Berner Sennenhunde und Kontrollhunde	40
Tabelle 16: Vergleich Borreliose-Serologie - C ₆ - ELISA (SNAP-Test)	40
Tabelle 17: Vergleich Borreliose-Serologie - C ₆ -ELISA (SNAP-Test) nur Berner Sennenhunde	41
Tabelle 18: Borreliose-Serologie - C ₆ -ELISA (SNAP-Test) nur Kontrollhunde	41
Tabelle 19: Hunde UPC > 0.3 aus beiden Studien	41
Tabelle 20: Mikroalbuminurie-Test positive Hunde aus beiden Studien	42
Tabelle 21: Verlauf Mikroalbuminurie	43
Tabelle 22: Urin Proteinelektrophorese der Hunde aus beiden Studien	43

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: C ₆ -ELISA (SNAP-Test)	44
Abbildung 2: Western Blot Streifen	44
Abbildung 3: Todesalter verstorbene Hunde	45
Abbildung 4: Untersuchungsabstand (Tage)	45
Abbildung 5: Verteilung der Hunde in der Schweiz	46
Abbildung 6: Spezifisches Gewicht des Urins aller Hunde aus beiden Studien (n = 162)	47
Abbildung 7: Mikroalbumin-Test	48
Abbildung 8: SDS-Agarose-Gel-Elektrophorese	48

8 Anhang

8.1 Tabellen

Tabelle 1: Übersicht verfolgte Hunde

	BSH	KH	Summe
Besucht	53 (64%)	30 (48%)	83
Verstorben	26 (31%)	14 (23%)	40
Kein Zugang	4 (5%)	18 (29%)	22
Summe	83 (100%)	62 (100%)	145

BSH = Berner Sennenhunde, KH = Kontrollhunde

Tabelle 2: Übersicht Hunde ohne Zugang: Antikörperstatus/Urin-Protein-Kreatinin Verhältnis (UPC)

	Antikörperstatus	UPC < 0.3	UPC > 0.3	Summe
BSH	pos	2	1	3
	neg	-	1	1
KH	pos	2	-	2
	neg	15	1	16
Summe		19	3	22

BSH = Berner Sennenhunde; KH = Kontrollhunde; pos = Antikörper positiv; neg = Antikörper negativ

Tabelle 3: Übersicht verstorbene Hunde: Antikörperstatus/Urin-Protein-Kreatinin Verhältnis (UPC)

	Antikörperstatus	UPC < 0.3	UPC > 0.3	Summe
BSH	pos	9	9	18
	neg	6	1	7
KH	pos	-	-	-
	neg	13	1	14
Summe		18	11	39

BSH = Berner Sennenhunde; KH = Kontrollhunde; pos = Antikörper positiv; neg = Antikörper negativ

1 Antikörper-positiver Berner Sennenhund ist nicht in der Tabelle aufgeführt, da kein UPC vorhanden war.

Tabelle 4: Rasse, Anzahl und % aller verstorbenen

Rasse	Anzahl	% aller verstorbenen Hunde
BSH	26	65
Landseer	11	27
Pyrenäen Berghund	1	3
Mischling	2	5

BSH = Berner Sennenhunde

Tabelle 5: Gesicherte Todesursachen

Pos	UPC < 0.3	<ul style="list-style-type: none"> BSH, 8 Jahre, papilläres Adenom (Lunge); Vollsektion
	UPC > 0.3	<ul style="list-style-type: none"> BSH, 7 Jahre, membranöse GN, Tubulusnekrose, interstitielle Nephritis, bronchoalveoläres Karzinom, interstitielle Pneumonie, Vollsektion BSH, 9 Jahre, Lymphom, Zytologie BSH, 6 Jahre, maligne Histiozytose, Zytologie
Neg	UPC < 0.3	<ul style="list-style-type: none"> BSH, 4 Jahre, Lymphom, Zytologie BSH, 6 Jahre, maligne Histiozytose, Vollsektion KH, 6 Jahre, Lymphom, Zytologie
	UPC > 0.3	<ul style="list-style-type: none"> KH, 8 Jahre, Lymphom, Vollsektion

pos = Antikörper positiv; neg = Antikörper negativ; GN = Glomerulonephritis;
BSH = Berner Sennenhunde; KH = Kontrollhunde

Tabelle 6: Todesursache nach Besitzeraussage

Todesursache	BSH	KH
Alter	2	2
Unfall	1	3
Osteosarkom	1	2
Vomitus/ Diarrhoe	1	2
Arthritis	2	0
Glomerulonephritis	2	0
Osteomyelitis	0	2
Lungentumor	1	0
Lymphom	1	0
grosse Lymphknoten	1	0
Magendrehung	1	0
maligne Histiozytose	1	0
Milzhämatom	1	0
Milztumor	1	0
spinale Myelopathie	1	0
Wirbelsäulenerkrankung	1	0

Unbekannt	2	1
Summe	20	12

BSH = Berner Sennenhunde; KH = Kontrollhunde

Tabelle 7: Borreliose-Serologie verstorbener Hunde

	neg	pos	Summe
BSH	4 (16%)	21 (84%)	25 (100%)
KH	11 (92%)	1 (8%)	12 (100%)
Summe	15	22	37

BSH = Berner Sennenhunde; KH = Kontrollhunde; neg = Antikörper negativ;
pos = Antikörper positiv

Tabelle 8: Übersicht besuchte Hunde: Antikörperstatus/Urin-Protein-Kreatinin Verhältnis (UPC)

	Antikörperstatus	UPC < 0.3	UPC > 0.3	Summe
BSH	pos	26	-	26
	neg	23	3	26
KH	pos	8	1	9
	neg	21	-	21
Summe		78	4	82

BSH = Berner Sennenhunde; KH = Kontrollhunde; pos = Antikörper positiv;
neg = Antikörper negativ

1 Antikörper positiver BSH ohne UPC fehlt in der Tabelle

Tabelle 9: Untersuchte Hunde

Rasse	Anzahl	Alter [Jahre]		Geschlecht				Fellfarbe
		Bereich	Median	w	wk	m	mk	
Berner Sennenhunde	53	3-11	6	27	13	12	1	dunkel
Landseer	14	4-10	6	5	3	5	1	hell
Neufundländer	9	5-10	8	4	4	1	0	dunkel
Flat-coated Retriever	2	3/8	5.5	1	1	0	0	dunkel
Belgischer Schäferhund	1	4	4	0	1	0	0	hell
Tibetan Mastiff	1	6	6	0	0	1	0	hell
Mischling	2	6/8	7	0	0	0	2	1 hell, 1 dunkel
Golden Retriever	1	7	7	0	1	0	0	hell
Kontrollhunde total	30	3-10	7	10	10	7	3	17 hell, 12 dunkel

w = weiblich; wk = weiblich, kastriert; m = männlich; mk = männlich kastriert

Tabelle 10: Anamnese der Hunde

		Berner Sennenhunde	Kontrollhunde
Zeckenvorkommen	Ja	27	16
	Nein	26	14
Zeckenschutz	Keiner	24	0
	ExSpot®	17	13
	Frontline®	6	11
	Zeckennodose	2	0
	Halsband	2	0
	Advantix®	2	2
Frühere Erkrankungen	Keine	46	25
	Borreliose	1	1
	Enzephalitis	1	0
	Nierenerkrankung	1	0
	Gebärmuttererkrankung	1	0
	Blasenentzündung	1	0
	Zwingerhusten	0	4
	IHA	1	0
	Nierenbeckenentzündung	1	0
Allgemeinzustand	Normal	50	25
	Alter Hund	3	5
Kondition	Normal	49	22
	Herabgesetzt	4	8
Gewichtsverlust	Ja	51	30
	Nein	2	0
Hautknoten	Ja	47	24
	Nein	6	6
Appetit	Normal	50	28
	Herabgesetzt	1	0
	Vermehrt	2	2
Durst	Normal	53	30
Erbrechen	Nein	53	29
	Ja	0	1
Husten	Nein	52	30
	Ja	1	0
Harnabsatz	Normal	53	29
	Vermehrt	0	1
Kotabsatz	Normal	53	29
	Verstopft	0	1
Lahmheit	Nein	48	25
	Ja	4	4
	Arthrose	1	1
Fieber	Nein	53	30
Ödeme	Nein	53	30
Auslandsaufenthalt	Nein	42	16
	Ja	9	14
Momentane Medikamente	Keine	48	26
	Prednisolon/Imurek®	1	0
	Rimadyl®	2	0
	Fortekor®	1	0
	Karsivan®	1	0
	Arthri-Dog®	0	2
	Atopica®	0	1

Tabelle 11: Blutwerte Folgestudie

Werte	Referenz- bereich Labor	Berner Sennenhunde		Kontrollhunde	
		Bereich	Median	Bereich	Median
Hämatokrit [%]	42-55	36-54	46	34-55	47
Leukozyten [$10^3/\mu\text{l}$]	4.7-11.3	4.8-17.8	8.7	4.1-9.7	6.45
Neutrophile Granulozyten [$10^3/\mu\text{l}$]	2.496-7.437	2.3-12.4	3.66	1.97-7.03	3.66
Eosinophile Granulozyten [$10^3/\mu\text{l}$]	0.119-1.287	0.07-2.2	0.52	0.041-1.52	0.5
Monozyten [$10^3/\mu\text{l}$]	0.198-1.917	0.12-8.3	0.44	0.041-0.34	0.34
Lymphozyten [$10^3/\mu\text{l}$]	1.154-3.399	0.91-22.23	2.08	0.77-3.89	1.915
Bilirubin gesamt [$\mu\text{mol/l}$]	2.5-7.6	0.5-3.3	1.8	0.6-3.9	1.75
Glukose im Serum [mmol/l]	4.1-5.9	3.1-5.2	4.2	0.6-5.3	4.4
Harnstoff [mmol/l]	3.8-9.4	3.6-15.1	6.6	1.7-6.7	4.5
Kreatinin [$\mu\text{mol/l}$]	50-119	64-260	102	52-110	76
Protein (Biuret) [g/l]	56-71	53-73	64	58-74	62
Albumin [g/l]	29-37	22-38	34	30-40	34
Cholesterin [mmol/l]	3.5-8.6	4.2-9.5	6.5	4.4-11.7	6.95
Alkalische Phosphatase [U/l]	20-98	20-172	56	18-253	51.5
Amylase [U/l]	377-1244	447-2472	881	18-1016	518
ASAT [U/l]	20-44	17-42	28	18-49	24
ALAT [U/l]	20-93	29-161	45	13-106	28
Natrium [mmol/l]	152-159	150-159	153	150-161	154
Kalium [mmol/l]	4.3-5.3	4.5-5.7	5.1	4.7-5.9	5.1
Kalzium [mmol/l]	2.4-2.8	2.36-2.97	2.65	2.23-2.79	2.58
Phosphor [mmol/l]	1.0-1.6	0.93-1.66	1.19	0.93-1.75	1.195

Tabelle 12: Blutwerte vorhergehende Studie

Werte	Referenz- bereich Labor	Berner Sennenhunde		Kontrollhunde	
		Bereich	Median	Bereich	Median
Hämatokrit [%]	42-55	41-63	50.5	40-57	49
Leukozyten [$10^3/\mu\text{l}$]	4.7-11.3	5.9-20.3	9.7	3.5-11.2	8.1
Neutrophile Granulozyten [$10^3/\mu\text{l}$]	2.496-7.437	3.12-14.3	5.62	2.15-7.05	4.12
Eosinophile Granulozyten [$10^3/\mu\text{l}$]	0.119-1.287	0.007-1.56	0.6715	0.029-1.45	0.485
Monozyten [$10^3/\mu\text{l}$]	0.198-1.917	0.055-2.4	0.773	0.034-0.844	0.48
Lymphozyten [$10^3/\mu\text{l}$]	1.154-3.399	1.01-4.61	2	0.47-2.9	1.755

Werte	Referenz- bereich Labor	Berner Sennenhunde		Kontrollhunde	
		Bereich	Median	Bereich	Median
Bilirubin gesamt [µmol/l]	2.5-7.6	2.2-19.4	4.2	2.2-8.4	3.7
Glukose im Serum [mmol/l]	4.1-5.9	3.4-5.3	4.3	2.7-5.3	4.5
Harnstoff [mmol/l]	3.8-9.4	3.1-13.1	6.7	3.4-8.6	6.7
Kreatinin [µmol/l]	64-125	74-155	101	66-119	84.5
Protein (Biuret) [g/l]	56-71	43-74	63	50-67	61
Albumin [g/l]	29-37	21-34	30	28-35	31
Cholesterin [mmol/l]	3.5-8.6	3.6-9.7	6.6	4.3-10.8	7.1
Alkalische Phosphatase [U/l]	20-98	22-244	63	14-134	47
Amylase [U/l]	377-1244	388-1710	806	373-1050	535
ASAT [U/l]	20-44	19-55	30	14-39	25
ALAT [U/l]	20-93	29-234	47	15-98	31
Natrium [mmol/l]	152-159	148-156	153	151-157	154
Kalium [mmol/l]	4.3-5.3	4.9-6.5	5.4	4.7-5.7	5.1
Kalzium [mmol/l]	2.4-2.8	2.15-2.91	2.56	2.05-2.78	2.425
Phosphor [mmol/l]	1.0-1.6	1.09-3.03	1.44	1.05-3.28	1.365

Tabelle 13: Azotämische Hunde aus beiden Studien

Nummer	Geschlecht	Alter/Jahre	Harnstoff/mmol/l	Kreatinin/ µmol/l	SG	Bor
17 _S	wk	3	9.9	114	1.006	neg
58 _S	w	1	10.3	102	1.029	neg

7 _K	wk	5	11.7	119	1.024	pos
10 _K	wk	10	11.0	96	1.043	pos
13 _K	wk	11	13.7	138	1.017	pos
51 _K	w	3	6.9	123	1.018	pos
67 _K	wk	11	10.0	82	1.043	pos
77 _K	wk	4	6.5	135	1.033	neg
92 _K	m	5	6.6	129	1.014	pos
97 _K	m	7	6.6	130	1.035	neg

71 _S	w	1	12.0	95	1.050	neg
71 _K	w	3	10.0	116	1.030	pos

73 _S	w	3	13.1	104	1.025	neg
73 _K	w	6	15.1	260	1.009	neg

84 _s	wk	6	7.5	155	1.014	neg
84 _k	wk	9	7.9	175	-	neg

160 _s	m	2	7.1	131	1.023	neg
160 _k	m	4	8.2	144	1.033	neg

κ = Hunde aus Folgestudie; s = Hunde aus Vorstudie; w = weiblich; wk = weiblich, kastriert; m = männlich; SG = spezifisches Gewicht (Urin); Bor = Borreliose-Ergebnis; pos = positiv; neg = negativ

Fett markiert sind Werte, welche nicht im Referenzbereich liegen

Tabelle 14: Borreliose-Antikörper Entwicklung

Neu \ Alt			
	neg	pos	Summe
neg	33 (70%)	13 (36%)	46
pos	14 (30%)	23 (64%)	37
Summe	47 (100%)	36 (100%)	83

Alt = Hunde aus Vorstudie; Neu = Hunde aus Folgestudie; neg = Antikörper negativ; pos = Antikörper positiv

Tabelle 15: Borreliose-Antikörper Entwicklung Berner Sennenhunde und Kontrollhunde

Neu \ Alt	BSH (N=53)		KH (N=30)	
	neg	pos	neg	pos
neg	17 (68%)	11 (39%)	16 (73%)	2 (25%)
pos	8 (32%)	17 (61%)	6 (27%)	6 (75%)
Summe	25 (100%)	28 (100%)	22 (100%)	8 (100%)

Alt = Hunde aus Vorstudie; Neu = Hunde aus Folgestudie; BSH = Berner Sennenhunde; KH = Kontrollhunde; neg = Antikörper negativ; pos = Antikörper positiv

Tabelle 16: Vergleich Borreliose-Serologie - C₆- ELISA (SNAP-Test)

		C ₆ -ELISA		Gesamt
		negativ	positiv	
Bor	negativ	71 (78%)	20 (22%)	91 (100%)
	positiv	14 (20%)	57 (80%)	71 (100%)
Gesamt		85	77	162

Bor = Borreliose-Serologie; neg = Antikörper negativ; pos = Antikörper positiv

Bei 4 Hunden (1 BSH und 3 Kontrollhunde, alle Borreliose negativ) aus der Vorstudie konnte kein C₆-ELISA durchgeführt werden

Tabelle 17: Vergleich Borreliose-Serologie - C₆-ELISA (SNAP-Test) nur Berner Sennenhunde

		C ₆ -ELISA		Gesamt
		negativ	positiv	
Bor	negativ	36 (68%)	17 (32%)	53 (100%)
	positiv	2 (4%)	50 (96%)	52 (100%)
Gesamt		38	67	105

Bor = Borreliose-Serologie; neg = Antikörper negativ; pos = Antikörper positiv

Tabelle 18: Borreliose-Serologie - C₆-ELISA (SNAP-Test) nur Kontrollhunde

		C ₆ -ELISA		Gesamt
		negativ	positiv	
Bor	negativ	35 (92%)	3 (8%)	38 (100%)
	positiv	12 (63%)	7 (37%)	19 (100%)
Gesamt		47	10	57

Bor = Borreliose-Serologie; neg = Antikörper negativ; pos = Antikörper positiv

Tabelle 19: Hunde UPC > 0.3 aus beiden Studien

Nummer	Rasse	Alter	UPC	SG	Bor
95 _S	BSH	1	0.42	1.028	neg
137 _S	BSH	4	0.32	1.046	neg

13 _K	BSH	11	5.61	1.017	pos
43 _K	BSH	8	0.44	1.050	pos
99 _K	BSH	6	0.35	1.046	pos
116 _K	BSH	8	0.36	1.026	pos
129 _K	BSH	5	0.32	1.041	pos
e _K	NFL	10	0.36	1.009	neg
zy _K	LS	8	0.53	1.030	neg

73 _S	BSH	3	0.72	1.025	neg
73 _K	BSH	6	1.26	1.009	neg

o _S	NFL	7	0.48	1.043	pos
o _K	NFL	8	0.92	1.046	pos

κ = Hunde aus Folgestudie; s = Hunde aus Vorstudie; SG = spezifisches Gewicht (Urin); Bor = Borreliose Ergebnis; BSH = Berner Sennenhunde; NFL = Neufundländer; LS = Landseer; neg = Antikörper negativ; pos = Antikörper positiv

Tabelle 20: Mikroalbuminurie-Test positive Hunde aus beiden Studien

Nummer	Rasse	Alter	Mikalb	UPC	SG	AGE	Bor
13 _s	BSH	8	leicht	0.11	1.016	Phys	pos
13 _k	BSH	11	stark	5.61	1.017	Gemischt	pos
43 _s	BSH	5	leicht	0.11	1.050	Fehlt	pos
43 _k	BSH	8	leicht	0.44	1.050	Glom	pos
73 _s	BSH	3	stark	0.72	1.025	Alb	neg
73 _k	BSH	6	stark	1.26	1.009	Alb	neg
116 _s	BSH	5	leicht	0.16	1.029	Phys	pos
116 _k	BSH	8	mittel	0.36	1.026	Alb	pos
129 _s	BSH	2	stark	0.28	1.048	Alb	pos
129 _k	BSH	5	stark	0.32	1.041	Glom	pos
142 _s	BSH	5	leicht	0.20	1.035	Fehlt	neg
142 _k	BSH	8	stark	0.29	1.020	Alb	neg
154 _s	BSH	5	leicht	0.11	1.019	Fehlt	pos
154 _k	BSH	8	leicht	0.10	1.030	Phys	pos
o _s	NFL	7	- ¹	0.48	1.043	Alb	pos
o _k	NFL	8	stark	0.92	1.046	Glom	pos
z _s	NFL	8	stark	0.18	1.031	Alb	neg
z _k	NFL	10	stark	0.12	1.040	Phys	neg
zy _s	LS	6	stark	0.14	1.026	Alb	neg
zy _k	LS	8	stark	0.53	1.030	Glom	neg

k = Hunde aus Folgestudie; s = Hunde aus Vorstudie; Mikalb = Mikroalbumin-Test; SG = spezifisches Gewicht (Urin); AGE = SDS-Gelelektrophorese; Bor = Borreliose Ergebnis; BSH = Berner Sennenhunde; NFL = Neufundländer; LS = Landseer; Alb = Albumin; phys = physiologisch; fehlt = keine Gelelektrophorese durchgeführt; glom = glomeruläres Muster; gemischt = gemischtes Muster; neg = Antikörper negativ; pos = Antikörper positiv

¹ Testergebnis ist bei diesem Hund nicht vorhanden, da aber UPC > 0.3 und eine starke Bande im Bereich von Albumin vorhanden ist, ist dieser Hund trotzdem aufgeführt

Tabelle 21: Verlauf Mikroalbuminurie

Vorst. Folgest.	negativ		leicht		mittel		stark		Summe	
	BSH	KH	BSH	KH	BSH	KH	BSH	KH	BSH	KH
Negativ	13	24	4		2				37	24
Leicht	5	1	2						7	1
Mittel	1	1	1						2	1
Stark			2				2	2	4	2
Summe	37	26	9		2		2	2	50	28

Vorst. = Hunde aus Vorstudie; Folgest. = Hunde aus Folgestudie;
 BSH = Berner Sennenhund, KH = Kontrollhund; negativ = negativ im
 Mikroalbuminurie-Test; leicht = leicht positiv im Mikroalbuminurie-Test; mittel = mittel
 positiv im Mikroalbuminurie-Test; stark = stark positiv im Mikroalbuminurie-Test

Tabelle 22: Urin Proteinelektrophorese der Hunde aus beiden Studien

Nummer	Rasse	Alter	Mikalb	UPC	AGE	Bor
z _s	NFL	8	stark	0.18	Alb	Neg

2 _k	BSH	8	neg	0.13	Alb	Neg
3 _k	BSH	5	neg	0.21	tub	Pos
13 _k	BSH	11	stark	5.61	gemischt	Pos
43 _k	BSH	8	leicht	0.44	glom	Pos
95 _k	BSH	4	mittel	0.21	Alb	Pos
99 _k	BSH	6	leicht	0.35	glom	Pos
116 _k	BSH	8	mittel	0.36	Alb	Pos
141 _k	BSH	6	leicht	0.15	Alb	Pos
142 _k	BSH	8	stark	0.29	Alb	Neg
148 _k	BSH	8	leicht	0.14	Alb	Pos
e _k	NFL	10	mittel	0.36	Alb	Neg

73 _s	BSH	3	stark	0.72	Alb	Neg
73 _k	BSH	6	stark	1.26	Alb	Neg

129 _s	BSH	2	stark	0.28	Alb	Pos
129 _k	BSH	5	stark	0.32	glom	Pos

o _s	NFL	7	-	0.48	Alb	Pos
o _k	NFL	8	stark	0.92	glom	Pos

zy _s	LS	6	stark	0.14	Alb	Neg
zy _k	LS	8	stark	0.53	glom	Neg

_k = Hunde aus Folgestudie; _s = Hunde aus Vorstudie; Mikalb = Mikroalbuminurie-
 Test; AGE = SDS-Gelelektrophorese; Bor = Borreliose Ergebnis; BSH = Berner
 Sennenhund; NFL = Neufundländer; LS = Landseer; Alb = Albumin; phys
 = physiologisch; fehlt = keine Gelelektrophorese durchgeführt; glom = glomeruläres
 Proteinmuster; gemischt = gemischtes Proteinmuster; neg = Antikörper negativ;
 pos = Antikörper positiv

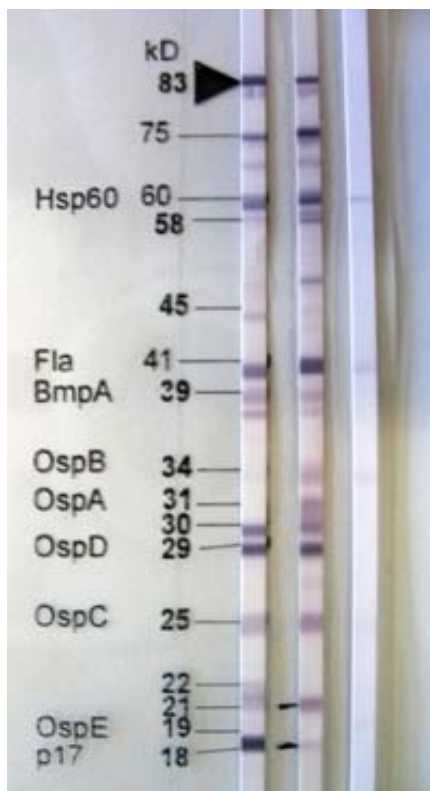
8.2 Abbildungen

Abbildung 1: C₆-ELISA (SNAP-Test)



links: gültiges Testergebnis, Borreliose-negativer Hund;
rechts: gültiges Testergebnis, Borreliose-positiver Hund

Abbildung 2: Western Blot Streifen



links: positiver Hund; Mitte: Kontrolle; rechts: negativer Hund

Abbildung 3: Todesalter verstorbene Hunde

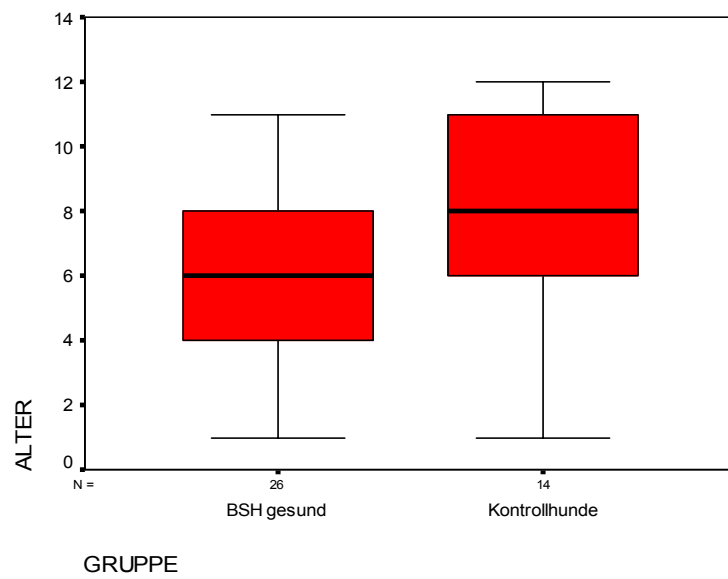


Abbildung 4: Untersuchungsabstand (Tage)

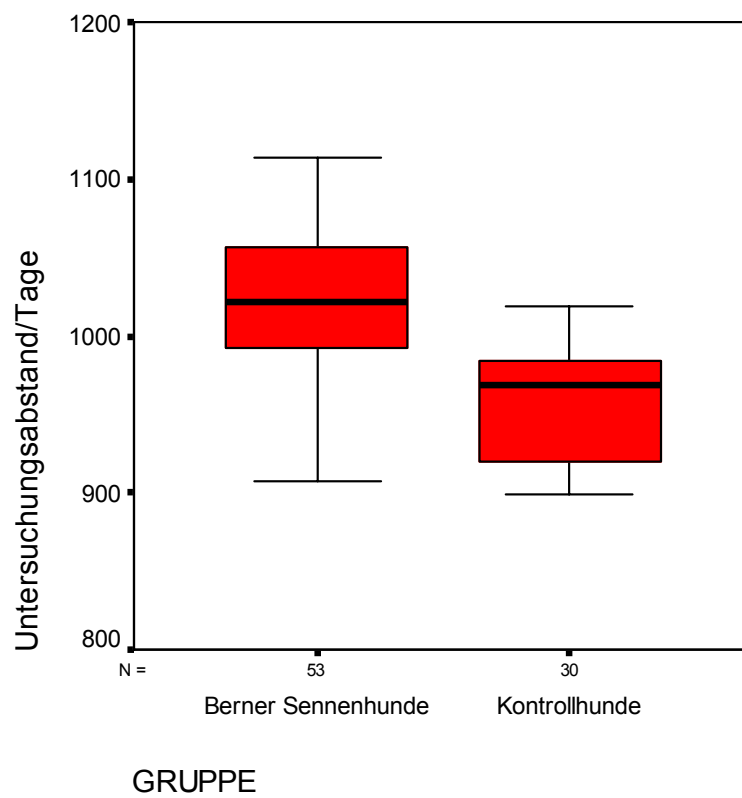
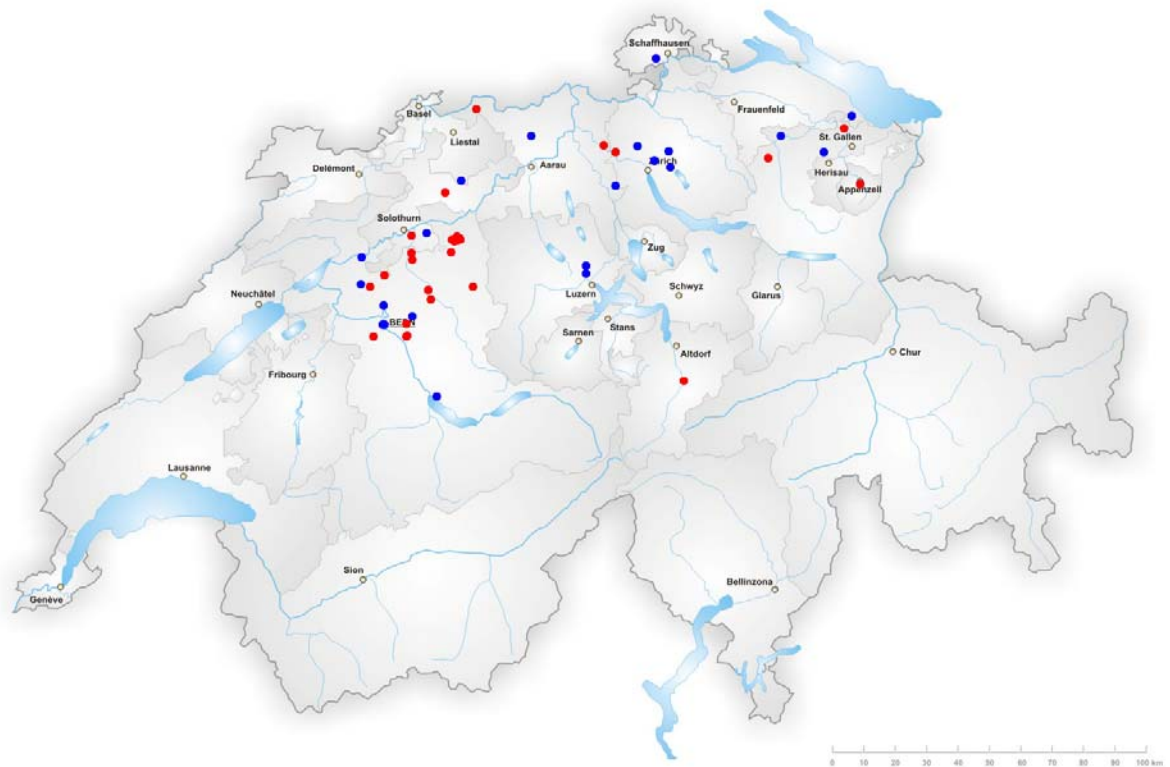
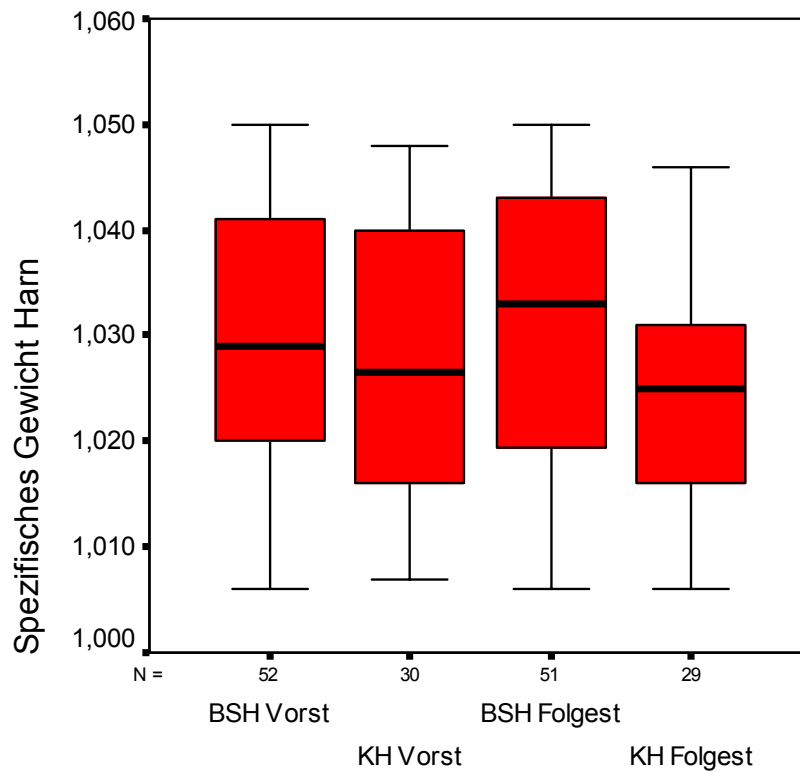


Abbildung 5: Verteilung der Hunde in der Schweiz



rote Punkte: Berner Sennenhunde; blaue Punkte: Kontrollhunde;
Ursprung: http://www.mygeo.info/landkarten_schweiz.html , diese Datei unterliegt der
GNU Free Documentation Licence

Abbildung 6: Spezifisches Gewicht des Urins aller Hunde aus beiden Studien
(n = 162)



Gruppe Vorstudie oder Folgestudie

Jede Box zeigt den Median, die Quartile und die Extremwerte an.

BSH Vorst = Berner Sennenhunde aus Vorstudie

KH Vorst = Kontrollhunde aus Vorstudie

BSH Folgest = Berner Sennenhunde aus Folgestudie

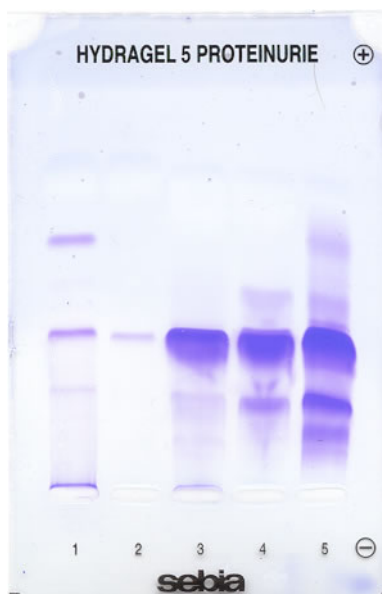
KH Folgest = Kontrollhunde aus Folgestudie

Abbildung 7: Mikroalbumin-Test



links: Mikroalbuminurie negativer Hund; rechts: Mikroalbuminurie positiver Hund

Abbildung 8: SDS-Agarose-Gel-Elektrophorese



Bahn 1: Kontrolle

Bahn 2: sehr leichte Bande bei Albumin (66 kDa), von uns als negativ gewertet

Bahn 3: starke Bande bei Albumin, glomeruläres Muster (≤ 66 kDa)

Bahn 4: starke Bande bei Albumin, glomeruläres Muster, Argininesterase (30 kDa) (intakter Rüde)

Bahn 5: gemischtes Muster, inklusive Bande im Bereich von Argininesterase bzw. freie Leichtketten (25 kDa) oder $\alpha 1$ Mikroglobulin (33 kDa) (intakte Hündin)

9 Literaturverzeichnis

- Abrass C. K.: Clinical spectrum and complications of the nephrotic syndrome. *J Investig Med* (1997), 45(4): 143-53.
- Alban P. S., Johnson P. W., Nelson D. R.: Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology* (2000), 146 (Pt 1): 119-27.
- Anderson J. F., Barthold S. W., Magnarelli L. A.: Infectious but nonpathogenic isolate of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* (1990), 28(12): 2693-9.
- Appel M. J., Allan S., Jacobson R. H., Lauderdale T. L., Chang Y. F., Shin S. J., Thomford J. W., Todhunter R. J., Summers B. A.: Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis* (1993), 167(3): 651-64.
- Arteaga F., Golightly M. G., Garcia Perez A., Barral M., Anda P., Garcia-Monco J. C.: Disparity between serological reactivity to *Borrelia burgdorferi* and evidence of past disease in a high-risk group. *Clin Infect Dis* (1998), 27(5): 1210-3.
- Bacon R. M., Biggerstaff B. J., Schriefer M. E., Gilmore R. D., Jr., Philipp M. T., Steere A. C., Wormser G. P., Marques A. R., Johnson B. J.: Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. *J Infect Dis* (2003), 187(8): 1187-99.
- Blum J. R., Cork L. C., Morris J. M., Olson J. L., Winkelstein J. A.: The clinical manifestations of a genetically determined deficiency of the third component of complement in the dog. *Clin Immunol Immunopathol* (1985), 34(3): 304-15.
- Bonnett B. N., Egenvall A., Hedhammar A., Olson P.: Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. *Acta Vet Scand* (2005), 46(3): 105-20.
- Bronson R. T.: Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *Am J Vet Res* (1982), 43(11): 2057-9.
- Brorson O., Brorson S. H.: Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. *Infection* (1997), 25(4): 240-6.
- Burgess E. C., Schneider E., Bosler E.: Testing for *Borrelia burgdorferi*. *J Am Vet Med Assoc* (1989), 195(7): 844, 846.
- Burkholder W. J., Lees G. E., LeBlanc A. K., Slater M. R., Bauer J. E., Kashtan C. E., McCracken B. A., Hannah S. S.: Diet modulates proteinuria in heterozygous female dogs with X-linked hereditary nephropathy. *J Vet Intern Med* (2004), 18(2): 165-75.
- Callister S. M., Jobe D. A., Schell R. F., Lovrich S. D., Onheiber K. L., Korshus J. B.: Detection of borreliacidal antibodies in dogs after challenge with *Borrelia burgdorferi*-infected ixodes scapularis ticks. *J Clin Microbiol* (2000), 38(10): 3670-4.
- Center S. A., Smith C. A., Wilkinson E., Erb H. N., Lewis R. M.: Clinicopathologic, renal immunofluorescent, and light microscopic features of glomerulonephritis in the dog: 41 cases (1975-1985). *J Am Vet Med Assoc* (1987), 190(1): 81-90.
- Chan D. W., Perlstein M. T.: General Principles of Immunoassay. In: Immunoassay, A Practical Guide. Hrsg. D. W. Chan und M. T. Perlstein, Academic Press, Inc., San Diego, (1987).
- Cohen N. D., Carter C. N., Thomas M. A., Jr., Angulo A. B., Eugster A. K.: Clinical and epizootiologic characteristics of dogs seropositive for *Borrelia burgdorferi* in Texas: 110 cases (1988). *J Am Vet Med Assoc* (1990), 197(7): 893-8.

- Cook A. K., Cowgill L. D.: Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: a review of 137 cases (1985-1992). *J Am Anim Hosp Assoc* (1996), 32(4): 313-22.
- Crippa M., Rais O., Gern L.: Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* (2002), 2(1): 3-9.
- Dambach D. M., Smith C. A., Lewis R. M., Van Winkle T. J.: Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987-1992). *Vet Pathol* (1997), 34(2): 85-96.
- de Silva A. M., Fikrig E., Hodzic E., Kantor F. S., Telford S. R., 3rd, Barthold S. W.: Immune evasion by tickborne and host-adapted *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis* (1998), 177(2): 395-400.
- de Silva A. M., Telford S. R., 3rd, Brunet L. R., Barthold S. W., Fikrig E.: *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine. *J Exp Med* (1996), 183(1): 271-5.
- DiBartola S. P., Tarr M. J., Parker A. T., Powers J. D., Pultz J. A.: Clinicopathologic findings in dogs with renal amyloidosis: 59 cases (1976-1986). *J Am Vet Med Assoc* (1989), 195(3): 358-64.
- Dotevall L., Hagberg L.: Adverse effects of minocycline versus doxycycline in the treatment of Lyme neuroborreliosis. *Clin Infect Dis* (2000), 30(2): 410-1.
- Eddy A.: Role of cellular infiltrates in response to proteinuria. *Am J Kidney Dis* (2001), 37(1 Suppl 2): S25-9.
- Egenvall A., Bonnett B. N., Hedhammar A., Olson P.: Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: II. Breed-specific age and survival patterns and relative risk for causes of death. *Acta Vet Scand* (2005), 46(3): 121-36.
- Egenvall A., Bonnett B. N., Shoukri M., Olson P., Hedhammar A., Dohoo I.: Age pattern of mortality in eight breeds of insured dogs in Sweden. *Prev Vet Med* (2000), 46(1): 1-14.
- Eichelberg H., Seine R.: [Life expectancy and cause of death in dogs. I. The situation in mixed breeds and various dog breeds]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* (1996), 109(8): 292-303.
- Eichenberger S.: Zu Vorkommen und Häufigkeit von Glomerulonephritis und Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* beim Berner Sennenhund. Dissertation, Klinik für Kleintiermedizin der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich, 2005.
- Eichenberger S., Gerber B.: Reihenuntersuchungen beim Berner Sennenhund zur Ermittlung des Zusammenhangs der Glomerulonephritis mit der Borreliose. *Vets* 2003.(2003).
- Fahrer H., Sauvain M. J., vd Linden S., Zhioua E., Gern L., Aeschlimann A.: Prevalence of Lyme borreliosis in a Swiss population at risk. *Schweiz Med Wochenschr* (1988a), 118(2): 65-9.
- Fahrer H., Sauvain M. J., Zhioua E., Van Hoecke C., Gern L. E.: Longterm survey (7 years) in a population at risk for Lyme borreliosis: what happens to the seropositive individuals? *Eur J Epidemiol* (1998), 14(2): 117-23.
- Fahrer H., van der Linden S. M., Sauvain M. J., Gern L., Zhioua E., Aeschlimann A.: The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme borreliosis in a population at risk. *J Infect Dis* (1991), 163(2): 305-10.
- Frank J. C.: Taking a hard look at *Borrelia burgdorferi*. *J Am Vet Med Assoc* (1989), 194(11): 1521.

- Gerber B.: Projekt Folgeuntersuchungen, Nierenerkrankungen und Borreliose beim Berner Sennenhund. Hunde/ Blässipost (2005), Volume(06): 61-62.
- Gerber B., Eichenberger S., Wittenbrink M. M., Joller-Nemelka H. I., Reusch C. E.: Complement protein C3, circulating immune complexes and antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bernese Mountain Dogs, ACVIM Abstract. JVIM (2006), 20(3): 739.
- Gerber B., Eichenberger S., Wittenbrink M. M., Reusch C. E.: Antibodies against *Borrelia burgdorferi* in Bernese Mountain Dogs. 14th ECVIM-CA Congress, Barcelona.(2004).
- Goldstein R.E., Sandler J.L., Bellohusen B.A., Erb H.N.: Microalbuminuria testing in asymptomatic Labrador Retrievers naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*, ACVIM Abstract. JVIM (2005), 19(3): 464.
- Goossens H. A., van den Bogaard A. E., Nohlmans M. K.: Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in The Netherlands. J Clin Microbiol (2001), 39(3): 844-8.
- Grauer G. F.: Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. J Small Anim Pract (2005), 46(10): 469-78.
- Grauer G. F., Burgess E. C., Cooley A. J., Hagee J. H.: Renal lesions associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a dog. J Am Vet Med Assoc (1988), 193(2): 237-9.
- Grauer G. F., Greco D. S., Getzy D. M., Cowgill L. D., Vaden S. L., Chew D. J., Polzin D. J., Barsanti J. A.: Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. J Vet Intern Med (2000), 14(5): 526-33.
- Grauer G. F., Oberhauser E. B., Basaraba R. J., Lappin M. R., Simpson D. F., Jensen W. A.: Development of microalbuminuria in dogs with heartworm disease, ACVIM 2001. JVIM (2002), 16(3): 352.
- Greenberg A.: Primer on Kidney Diseases. In: Hrsg. Academic Press, (2001).
- Greene Craig, Straubinger Reinhard: Borreliosis. In: Infectious Diseases of the dog and cat. Hrsg. C. Greene, Elsevier Inc., (2006), 417-435.
- Gustafson J. M., Burgess E. C., Wachal M. D., Steinberg H.: Intrauterine transmission of *Borrelia burgdorferi* in dogs. Am J Vet Res (1993), 54(6): 882-90.
- Hanincova K., Taragelova V., Koci J., Schafer S. M., Hails R., Ullmann A. J., Piesman J., Labuda M., Kurtenbach K.: Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. Appl Environ Microbiol (2003), 69(5): 2825-30.
- Hashida S., Imagawa M., Inoue S., Ruan K. H., Ishikawa E.: More useful maleimide compounds for the conjugation of Fab' to horseradish peroxidase through thiol groups in the hinge. J Appl Biochem (1984), 6(1-2): 56-63.
- Hauser U., Lehnert G., Lobentanzer R., Wilske B.: Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J Clin Microbiol (1997), 35(6): 1433-44.
- Hilton E., Tramontano A., DeVoti J., Sood S. K.: Temporal study of immunoglobulin M seroreactivity to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme borreliosis. J Clin Microbiol (1997), 35(3): 774-6.
- Hovius J. W., Hovius K. E., Oei A., Houwers D. J., van Dam A. P.: Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. J Clin Microbiol (2000), 38(7): 2611-21.

- Hovius K. E., Rijpkema S. G., Westers P., van der Zeijst B. A., van Asten F. J., Houwers D. J.: A serological study of cohorts of young dogs, naturally exposed to *Ixodes ricinus* ticks, indicates seasonal reinfection by *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Vet Q* (1999), 21(1): 16-20.
- Hubalek Z., Halouzka J.: Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol* (1997), 13(8): 951-7.
- Hubalek Z., Halouzka J., Juricova Z.: Investigation of haematophagous arthropods for borreliae--summarized data, 1988-1996. *Folia Parasitol (Praha)* (1998), 45(1): 67-72.
- Jacob F., Polzin D. J., Osborne C. A., Neaton J. D., Kirk C. A., Allen T. A., Swanson L. L.: Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *J Am Vet Med Assoc* (2005), 226(3): 393-400.
- Jacobson R. H., Chang Y. F., Shin S. J.: Lyme disease: laboratory diagnosis of infected and vaccinated symptomatic dogs. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* (1996), 11(3): 172-82.
- Jennette J. C.: Heptinstall's Pathology of the Kidney. In: Hrsg. Lippincott-Raven, (1998).
- Jensen W. A., Grauer G. F., Andrews J., Simpson D. F.: Prevalence of microalbuminuria in dogs, ACVIM Abstract. *JVIM* (2001), 15(3): 300.
- Joles J. A., Sanders M., Velthuisen J., Den Hertog J. M., Van Dijk C.: Proteinuria in intact and splenectomized dogs after running and swimming. *Int J Sports Med* (1984), 5(6): 311-6.
- Kalish R. A., McHugh G., Granquist J., Shea B., Ruthazer R., Steere A. C.: Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. *Clin Infect Dis* (2001), 33(6): 780-5.
- Kaysen G. A.: Albumin metabolism in the nephrotic syndrome: the effect of dietary protein intake. *Am J Kidney Dis* (1988), 12(6): 461-80.
- Keller D., Koster F. T., Marks D. H., Hosbach P., Erdile L. F., Mays J. P.: Safety and immunogenicity of a recombinant outer surface protein A Lyme vaccine. *Jama* (1994), 271(22): 1764-8.
- Kelly B., Finnegan P., Cormican M., Callaghan J.: Lyme disease and glomerulonephritis. *Ir Med J* (1999), 92(5): 372.
- Kirmizis D., Efstratiadis G., Economidou D., Diza-Mataftsi E., Leontsini M., Memmos D.: MPGN secondary to Lyme disease. *Am J Kidney Dis* (2004), 43(3): 544-51.
- Koeman J. P., Biewenga W. J., Gruys E.: Proteinuria in the dog: a pathomorphological study of 51 proteinuric dogs. *Res Vet Sci* (1987), 43(3): 367-78.
- Koirala C.D., Labato M. A., Ross L.A., Acierno M.J., Freeman L.M.: Survival of dogs with glomerulonephritis: 40 cases, ACVIM Abstract. *JVIM* (2006), 20(3): 787.
- Lees G. E., Brown S. A., Elliott J., Grauer G. E., Vaden S. L.: Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). *J Vet Intern Med* (2005), 19(3): 377-85.
- Lees G. E., Jensen W. A., Simpson D. F., Kashtan C. E.: Persistent albuminuria precedes onset of overt proteinuria in male dogs with X-linked hereditary nephropathy, ACVIM 2002. *JVIM* (2002), 16(3): 353.
- Leifer C. E., Matus R. E.: Chronic lymphocytic leukemia in the dog: 22 cases (1974-1984). *J Am Vet Med Assoc* (1986), 189(2): 214-7.

- Levy S. A., Magnarelli L. A.: Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. *J Am Vet Med Assoc* (1992), 200(3): 344-7.
- Levy S., O'Connor T. P., Hanscom J. L., Shields P.: Utility of an in-office C6 ELISA test kit for determination of infection status of dogs naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*. *Vet Ther* (2002), 3(3): 308-15.
- Liang F. T., Jacobson R. H., Straubinger R. K., Grooters A., Philipp M. T.: Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* (2000), 38(11): 4160-6.
- Liebisch G., Liebisch A.: Lyme-Borreliose beim Hund: Infektionsrisiko sowie Interpretation der Labordiagnose und Impfung. *Der praktische Tierarzt* (1999), 80(5): 404-409.
- Lindenmayer J., Weber M., Bryant J., Marquez E., Onderdonk A.: Comparison of indirect immunofluorescent-antibody assay, enzyme-linked immunosorbent assay, and Western immunoblot for the diagnosis of Lyme disease in dogs. *J Clin Microbiol* (1990), 28(1): 92-6.
- Lipsker D., Antoni-Bach N., Hansmann Y., Jaulhac B.: Long-term prognosis of patients treated for erythema migrans in France. *Br J Dermatol* (2002), 146(5): 872-6.
- Littman M. P., Goldstein R. E., Labato M. A., Lappin M. R., Moore G. E. (2005). ACVIM Small Animal Consensus Statement (Draft) on Lyme Disease in Dogs: Diagnosis, Treatment, and Prevention. 23rd Annual Veterinary Medical Forum, ACVIM. Baltimore.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* (1951), 193(1): 265-75.
- Macdougall D. F., Cook T., Steward A. P., Cattell V.: Canine chronic renal disease: prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. *Kidney Int* (1986), 29(6): 1144-51.
- Magnarelli L. A., Anderson J. F., Schreier A. B.: Persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs of New York and Connecticut. *J Am Vet Med Assoc* (1990), 196(7): 1064-8.
- Magnarelli L. A., Anderson J. F., Schreier A. B., Ficke C. M.: Clinical and serologic studies of canine borreliosis. *J Am Vet Med Assoc* (1987), 191(9): 1089-94.
- Marques A. R., Martin D. S., Philipp M. T.: Evaluation of the C6 peptide enzyme-linked immunosorbent assay for individuals vaccinated with the recombinant OspA vaccine. *J Clin Microbiol* (2002), 40(7): 2591-3.
- Matus R. E., Leifer C. E., MacEwen E. G., Hurvitz A. I.: Prognostic factors for multiple myeloma in the dog. *J Am Vet Med Assoc* (1986), 188(11): 1288-92.
- May C., Bennett D., Carter S. D.: Lyme disease in the dog. *Vet Rec* (1990), 126(12): 293.
- McKenna P., Clement J., Van Dijck D., Lauwerys M., Carey D., Van den Bogaard T., Bignon G.: Canine Lyme disease in Belgium. *Vet Rec* (1995), 136(10): 244-7.
- Michell A. R.: Longevity of British breeds of dog and its relationships with sex, size, cardiovascular variables and disease. *Vet Rec* (1999), 145(22): 625-9.
- Minkus G., Breuer W., Wanke R., Reusch C., Leuterer G., Brem G., Hermanns W.: Familial nephropathy in Bernese mountain dogs. *Vet Pathol* (1994), 31(4): 421-8.

- Moore G. E., Guptill L. F., Ward M. P., Glickman N. W., Faunt K. K., Lewis H. B., Glickman L. T.: Adverse events diagnosed within three days of vaccine administration in dogs. *J Am Vet Med Assoc* (2005), 227(7): 1102-8.
- Muller-Peddinghaus R., Trautwein G.: Spontaneous glomerulonephritis in dogs. II. Correlation of glomerulonephritis with age, chronic interstitial nephritis and extrarenal lesions. *Vet Pathol* (1977), 14(2): 121-7.
- Nowakowski J., Nadelman R. B., Sell R., McKenna D., Cavaliere L. F., Holmgren D., Gaidici A., Wormser G. P.: Long-term follow-up of patients with culture-confirmed Lyme disease. *Am J Med* (2003), 115(2): 91-6.
- O'Connor T. P., Esty K. J., Hanscom J. L., Shields P., Philipp M. T.: Dogs vaccinated with common Lyme disease vaccines do not respond to IR6, the conserved immunodominant region of the VlsE surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Clin Diagn Lab Immunol* (2004), 11(3): 458-62.
- Overduin L. M., van den Bogaard A. E.: [Lyme borreliosis in dogs]. *Tijdschr Diergeneeskde* (1997), 122(1): 7-9.
- Philipp M. T., Bowers L. C., Fawcett P. T., Jacobs M. B., Liang F. T., Marques A. R., Mitchell P. D., Purcell J. E., Ratterree M. S., Straubinger R. K.: Antibody response to IR6, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and in humans. *J Infect Dis* (2001), 184(7): 870-8.
- Poupon M.A., Lommano E., Humair P.F., Douet V., Rais O., Schaad M., Jenni L., Gern L.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* (2006), 72(1): 976-9.
- Preiss H.: Zur Glomerulonephritis beim Berner Sennenhund. Dissertation, Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich, 1991.
- Pressler B. M.: Detection of canine microalbuminuria using semi-quantitative test strips designed for use in human urine, ACVIM Abstract. *JVIM* (2001), 15(3): 264.
- Pressler B. M., Proulx D. A., Williams L. E., Jensen W. A., Vaden S. L.: Urine albumin concentration is increased in dogs with lymphoma or osteosarcoma, ACVIM 2003. *JVIM* (2003), 17(3): 404.
- Proschowsky H. F., Rugbjerg H., Ersboll A. K.: Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. *Prev Vet Med* (2003), 58(1-2): 63-74.
- Quinn P. J., Carter M. E., Markey B., Carter G. R., (Eds.): Clinical Veterinary Microbiology. In: Hrsg. Wolfe Publishing, (1994).
- Qureshi M. Z., New D., Zulqarni N. J., Nachman S.: Overdiagnosis and overtreatment of Lyme disease in children. *Pediatr Infect Dis J* (2002), 21(1): 12-4.
- Radecki S., Donnelly R., Jensen W. A., Stinchcomb D. T.: Effect of age and Breed on the Prevalence of microalbuminuria in dogs, ACVIM 2003. *JVIM* (2003), 17(3): 406.
- Reusch C., Hoerauf A., Lechner J., Kirsch M., Leuterer G., Minkus G., Brem G.: A new familial glomerulonephropathy in Bernese mountain dogs. *Vet Rec* (1994), 134(16): 411-5.
- Reusch C., Liehs M., Hoerauf A., Lechner J., Minkus G., Brem G., Leuterer G., Hermanns W., Kraft W.: [Preliminary report of an increased appearance of glomerulonephritis in young Bernese Mountain dogs]. *Tierarztl Prax* (1991), 19(2): 181-2.
- Saint Girons I., Gern L., Gray J. S., Guy E. C., Korenberg E., Nuttall P. A., Rijpkema S. G., Schonberg A., Stanek G., Postic D.: Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. *Zentralbl Bakteriol* (1998), 287(3): 190-5.

- Schaeffer R. C., Jr., Gratrix M. L., Mucha D. R., Carbajal J. M.: The rat glomerular filtration barrier does not show negative charge selectivity. *Microcirculation* (2002), 9(5): 329-42.
- Seltzer E. G., Gerber M. A., Cartter M. L., Freudigman K., Shapiro E. D.: Long-term outcomes of persons with Lyme disease. *Jama* (2000), 283(5): 609-16.
- Shadick N. A., Phillips C. B., Logigian E. L., Steere A. C., Kaplan R. F., Berardi V. P., Duray P. H., Larson M. G., Wright E. A., Ginsburg K. S., Katz J. N., Liang M. H.: The long-term clinical outcomes of Lyme disease. A population-based retrospective cohort study. *Ann Intern Med* (1994), 121(8): 560-7.
- Shanies T.A., Goldstein R.E., Njaa B.L., Atwater D.Z., Chang Y.F, Simpson K.W.: The Search for intact *Borrelia burgdorferi* bacteria in kidneys from dogs suspected of suffering from "Lyme Nephritis", ACVIM 2005. *JVIM* (2005), 19(3): 471.
- Shin S. J., Chang Y. F., Jacobson R. H., Shaw E., Lauderdale T. L., Appel M. J., Lein D. H.: Cross-reactivity between *B. burgdorferi* and other spirochetes affects specificity of serotests for detection of antibodies to the Lyme disease agent in dogs. *Vet Microbiol* (1993), 36(1-2): 161-74.
- Sigal L. H.: The polymerase chain reaction assay for *Borrelia burgdorferi* in the diagnosis of Lyme disease. *Ann Intern Med* (1994), 120(6): 520-1.
- Sigal L. H., Williams S.: A monoclonal antibody to *Borrelia burgdorferi* flagellin modifies neuroblastoma cell neuritogenesis in vitro: a possible role for autoimmunity in the neuropathy of Lyme disease. *Infect Immun* (1997), 65(5): 1722-8.
- Steere A. C., Taylor E., McHugh G. L., Logigian E. L.: The overdiagnosis of Lyme disease. *JAMA* (1993), 269(14): 1812-6.
- Straubinger R. K.: PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. *J Clin Microbiol* (2000), 38(6): 2191-9.
- Straubinger R. K., Straubinger A. F., Harter L., Jacobson R. H., Chang Y. F., Summers B. A., Erb H. N., Appel M. J.: *Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. *Infect Immun* (1997), 65(4): 1273-85.
- Straubinger R. K., Straubinger A. F., Summers B. A., Jacobson R. H.: Status of *Borrelia burgdorferi* infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: An experimental study. *J Infect Dis* (2000), 181(3): 1069-81.
- Straubinger R. K., Straubinger A. F., Summers B. A., Jacobson R. H., Erb H. N.: Clinical manifestations, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. *Wien Klin Wochenschr* (1998), 110(24): 874-81.
- Straubinger R. K., Summers B. A., Chang Y. F., Appel M. J.: Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* (1997), 35(1): 111-6.
- Summers B. A., Straubinger A. F., Jacobson R. H., Chang Y. F., Appel M. J., Straubinger R. K.: Histopathological studies of experimental lyme disease in the dog. *J Comp Pathol* (2005), 133(1): 1-13.
- Syfrig B.: Sanktionen, wenn Todesfallmeldung ausbleibt. *Hunde/ Blässipost* (2006), 6.
- Syme H. M., Elliott J.: Relation of survival time and urinary protein excretion on cats with renal failure and/or hypertension. *J Vet Intern Med* (2003), 17(3): 405 (abstract).

- Teinfalt M., Miller I., Loupal G., Thalhammer J. G., Gemeiner M.: Klinische Relevanz der quantitativen Bestimmung eines prostataspezifischen Proteins im Harn von Rüden. *Tierärztl Prax* (2000), 28(K): 127-131.
- Tjissen P.: Practice and theory of enzyme immunoassays. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Hrsg. R. H. Burdon und P. H. van Knippenberg, Elsevier Publishing, Amsterdam, (1985), 385-421.
- Vaden S. L.: Glomerular Disease. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Hrsg. S. J. Ettinger und E. C. Feldman, Elsevier, St. Louis, Missouri, (2005), 1786-1799.
- Vaden S. L.: Microalbuminuria: What is it and How do I Interpret it? 21st Annual ACVIM Forum, Charlotte.(2003).
- Vaden S. L., Jensen W. A., Longhofer S., Simpson D. F.: Longitudinal study of microalbuminuria in soft-coated wheaten terriers, ACVIM 2001. *JVIM* (2001), 15(3): 300.
- Vaden S.L.: The Meaning of Microalbuminuria in Dogs. 22nd Annual ACVIM Forum, Minneapolis.(2004).
- van Vonderen I. K., Kooistra H. S., Rijnberk A.: Intra- and interindividual variation in urine osmolality and urine specific gravity in healthy pet dogs of various ages. *J Vet Intern Med* (1997), 11(1): 30-5.
- Vilafranca M., Wohlsein P., Trautwein G., Leopold-Temmler B., Nolte I.: Histological and immunohistological classification of canine glomerular disease. *Zentralbl Veterinarmed A* (1994), 41(8): 599-610.
- Vos K., Van Dam A. P., Kuiper H., Bruins H., Spanjaard L., Dankert J.: Seroconversion for Lyme borreliosis among Dutch military. *Scand J Infect Dis* (1994), 26(4): 427-34.
- Walker D., Syme H. M., Markwell P., Elliott J.: Predictors of survival in healthy, non-azotemic cats. *J Vet Intern Med* (2004), 18(3): 417 (abstract).
- Wang G.: Direct detection methods for Lyme *Borrelia*, including the use of quantitative assays. *Vector Borne Zoonotic Dis* (2002), 2(4): 223-31.
- Wittenbrink M. M., Failing K., Krauss H.: Enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot analysis for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs. The impact of serum absorption with homologous and heterologous bacteria. *Vet Microbiol* (1996), 48(3-4): 257-68.
- Wormser G. P., Nadelman R. B., Nowakowski J., Schwartz I.: Asymptomatic *Borrelia burgdorferi* infection. *Med Hypotheses* (2001), 57(4): 435-8.
- Zatelli A., Bonfanti U.: Qualitative determination of proteinuria by SDS-PAGE in the healthy dog. *JVIM* (2002), 16(3): 389 (abstract).
- Zatelli A., Borgarelli M., Santilli R., Bonfanti U., Nigrisoli E., Zanatta R., Tarducci A., Guarraci A.: Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am J Vet Res* (2003), 64(5): 558-61.

Danksagungen

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Dr. Bernhard Gerber für die Überlassung des interessanten Themas und für die sehr gute Betreuung bedanken. Mein Dank geht natürlich auch an Frau Prof. Reusch für die Übernahme des Referats und für die finanzielle Unterstützung. Herrn Prof. Wittenbrink danke ich für die Übernahme des Korreferats, sowie für die fachliche Hilfe im Bereich der Bakteriologie. An dieser Stelle möchte ich Frau Dr. Katharina Hoelzle und Frau Anja Hamburger, ebenfalls vom Institut für Veterinärbakteriologie, in meinen Dank einschliessen, die viel Geduld mit mir hatten und mich in die Grundlagen der Laborarbeiten eingeführt haben, wie auch jederzeit für Fragen zur Verfügung standen.

Dem Team des Veterinärmedizinischen Labors möchte ich für die Bearbeitung der Proben herzlich danken, und auch dafür, dass sie mir die zum Teil verspätete Abgabe nachgesehen haben.

Vielen, vielen Dank auch an meine beiden Ausfahrt-Begleiter Franziska und Stefan, ihr wart mir eine grosse Hilfe, sowie an meine Mitdoktoranden für die schöne gemeinsame Büro-Zeit. Liebe Martha, vielen Dank, dass ich mit kleineren und grösseren Problemen zu Dir kommen konnte, und Du stets ein offenes Ohr für mich hattest.

Dem Schweizerischen Klub für Berner Sennenhunde und den Berner Sennenhunde-Züchtern und -Haltern vielen Dank für die finanzielle Unterstützung, sowie für die Bereitschaft, erneut mit ihren Hunden an unserer Untersuchung teilzunehmen.

Ebenfalls herzlichen Dank an den Schweizerischen Neufundländer und Landseer Klub für die Motivation seiner Mitglieder und an die Neufundländer- und Landseer-Züchter und Haltern für die erneute Teilahme an dieser Studie. Finanzielle Unterstützung erhielt die vorliegende Studie ebenfalls von der Albert-Heim-Stiftung, vielen Dank.

Vielen Dank an die Firma IDEXX für die kostenlose Bereitstellung der C₆-ELISAs.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei Herrn Dr. Forster in meiner Heimatstadt Singen bedanken, der mir als erster Einblicke in den Beruf des Tierarztes gewährt hat, und der mich in meinem Berufsvorhaben immer wieder bestärkt hat.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für die Finanzierung meines Studiums und für die Hilfe bei den Korrekturen bedanken sowie dafür, dass sie immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe und Dir, lieber Uwe, vielen, vielen Dank, dass Du mit soviel Geduld meine Launen ausgehalten und immer wieder die hier vorliegende Arbeit gelesen hast.

Lebenslauf

Name	Katharina, Haug
Geburtsdatum	15.03.1980
Geburtsort	Freiburg i. Breisgau
Nationalität	Deutsch

1986 – 1989	Grundschule Alexander v. Humboldt Lima/ Peru
1990	Beethoven-Grundschule Singen a. Hohentwiel/ Deutschland
1990 – 1999	Hegau-Gymnasium Singen a. Hohentwiel
1999	Abschluss: Abitur

1999 – 2003	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München, Deutschland
2003	Auslandssemester (SS 2003) (Erasmus) Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich, Schweiz
2004 – 2005	3. Staatsexamen an der LMU, Deutschland

2005 – 2006	Dissertation, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich, Schweiz
-------------	---

2. November 2006